



06-29-06

AF  
JFW

Docket No.: 48194CPA(70342)  
(PATENT)

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of:  
Masahiko Fujino

Application No.: 09/257,650

Confirmation No.: 2632

Filed: February 25, 1999

Art Unit: 1647

For: USE AND SCREENING METHOD FOR AN  
ABERRANT GENE PRODUCT-  
OPERATING SUBSTANCE

Examiner: S. H. Shafer

**SUPPLEMENTAL RESPONSE**

MS AF  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

**INTRODUCTORY COMMENTS**

Further to our Response dated June 13, 2006 to the Final Office Action dated April 13, 2006, enclosed herewith please find the executed Verification Statement and Certified copy of JP 1997-083758.

**REMARKS**

In view of the above amendment, applicant believes the pending application is in condition for allowance.

Dated: June 27, 2006

Respectfully submitted,

By

Jonathan M. Sparks, Ph.D.

Registration No.: 53,624

EDWARDS ANGELL PALMER & DODGE  
LLP

P.O. Box 55874

Boston, Massachusetts 02205

(617) 439-4444

Attorneys/Agents For Applicant


Attorney Docket No.: 48194CPA(70342)

# Certificate of Express Mailing Under 37 CFR 1.10

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as Express Mail, Airbill No. EV 755 076 334 US in an envelope addressed to:

**MS Amendment  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450**

on June 27, 2006  
Date

  
Signature

**Sharon Bizokas**

Typed or printed name of person signing Certificate

Registration Number, if applicable

Telephone Number

**Note:** Each paper must have its own certificate of mailing, or this certificate must identify each submitted paper.

**Supplemental Response (1 page)  
Executed Verification Statement  
Certified copy of JP 1997-083758  
Return Receipt Postcard**

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Kiyomi NAKANO, having my business place at 17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, OSAKA 532-8686 JAPAN, Takeda Pharmaceutical Company Limited, do hereby declare that I am conversant in Japanese and English language and that I am the translator of the documents attached and certify that to the best of my knowledge and belief the following is a true and correct English translation of the specification contained in the Japanese Patent Application No. 1997-83758.

Signature :

*Kiyomi Nakano*  
Kiyomi NAKANO

This      day of June, 2006

*KN*

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

[Document Name] Patent Application  
[Reference Number] A97061  
[Filing Date] April 2, 1997  
[Addressee] Commissioner of the Patent Office  
[International Classification] A61K 35/00  
[Title of the Invention] Use and screening method for an aberrant  
gene product-operating substance  
[Number of Claims] 26  
[Inventor]  
[Residence] 10-7, Hibarigaoka 2-chome, Takarazuka-shi, HYOGO  
[Name] Masahiko Fujino  
[Applicant for patent]  
[Identification Number] 000002934  
[Name] Takeda Chemical Industries, LTD.  
[Representative] Kunio Takeda  
[Attorney]  
[Identification Number] 100073955  
[Patent Attorney]  
[Name] Tadao Asahina  
[Appointed Attorney]  
[Identification Number] 100077012  
[Patent Attorney]  
[Name] Ryo Iwatani  
[Official Fee]  
[Prepayment Register Number] 005142  
[Amount of Payment] 21000  
[List of What Is Submitted]  
[Item] Specification 1  
[Item] Abstract 1  
[General Power of Attorney] 9000052  
[General Power of Attorney] 9000053  
[Request of poof] Yes

[Document] Specification

[Title of the Invention] Use and screening method for an aberrant gene product-operating substance

[Claims]

[Claim 1] A pharmaceutical composition for preventing or treating a disease caused by an aberrant gene product, which comprises said aberrant gene product-operating substance.

[Claim 2] The pharmaceutical composition according to claim 1, wherein the aberrant gene product is an aberrant receptor, an aberrant channel, an aberrant transporter or an aberrant enzyme.

[Claim 3] The pharmaceutical composition according to claim 1, which is a pharmaceutical composition for preventing or treating a disease caused by an aberrant receptor, which comprises said aberrant receptor-operating substance.

[Claim 4] The pharmaceutical composition according to claim 3, wherein the disease caused by an aberrant receptor is a disease caused by substantial reduction in the activity of the signal transduction system of the cell having the aberrant receptor.

[Claim 5] The pharmaceutical composition according to claim 3, wherein the disease caused by an aberrant receptor is a disease caused by the substantial absence of the action of a natural ligand on the signal transduction system of the cell having the aberrant receptor.

[Claim 6] The pharmaceutical composition according to claim 3, wherein the disease caused by an aberrant receptor is a disease caused by substantial reduction in the affinity of a natural ligand for the aberrant receptor.

[Claim 7] The pharmaceutical composition according to claim 5, wherein the signal transduction system is a signal transduction system based on the change in intracellular concentration of a responding substance resulting from the binding of a natural ligand and a receptor.

[Claim 8] The pharmaceutical composition according to claim 7, wherein the responding substance is cAMP, inositol phosphate(s) or calcium ion.

[Claim 9] The pharmaceutical composition according to claim 3, wherein the aberrant receptor-operating substance is a substance that operates the normal receptor.

[Claim 10] The pharmaceutical composition according to claim 3, wherein the aberrant receptor-operating substance is a substance that does not operate the normal receptor.

[Claim 11] Use of an aberrant gene product-operating substance for treating a disease caused by said aberrant gene product.

[Claim 12] The use according to claim 10, wherein the aberrant gene product is an aberrant receptor.

[Claim 13] A method of screening for an aberrant gene product-operating substance, which comprises bringing an aberrant gene product into contact with a subject substance and assaying the operation activity of said substance on said product.

[Claim 14] The screening method according to claim 13, wherein the aberrant gene product is an aberrant receptor.

[Claim 15] The screening method for a substance for treating a disease caused by an aberrant gene product, which comprises bringing an aberrant gene product into contact with a subject substance and assaying the operation activity of said substance on said product.

[Claim 16] A method of screening for a drug for substantially operating the transduction system of a cell having an aberrant receptor of a mammal suffering from a disease caused by the aberrant receptor, which comprises bringing the aberrant receptor into contact with a subject substance and assaying the activity of said substance on said receptor

[Claim 17] The screening method according to claim 15, wherein the aberrant receptor is an aberrant receptor prepared by expressing in a cell the gene encoding the aberrant receptor.

[Claim 18] The screening method according to claim 17, wherein the gene encoding the aberrant receptor is an aberrant receptor-encoding gene specified by comparative analysis of a gene prepared from a cell of a mammal suffering from a disease caused by the aberrant receptor, and a gene prepared from a cell of a mammal of the same species that does not carry the aberrant receptor.

[Claim 19] A method of preparing a drug for treating a disease caused by an aberrant gene product, which comprises bringing the aberrant gene product into contact with a subject substance, assaying the activity of said substance on said product and preparing a substance judged to substantially operate the signal transduction system of a cell having the aberrant gene product.

[Claim 20] A method of preparing a substance for treating a disease caused by an aberrant receptor, which comprises bringing the aberrant receptor into contact with a subject substance, assaying the activity of said substance on the aberrant receptor and preparing a substance judged to substantially operate the signal transduction system of a cell having the aberrant receptor.

[Claim 21] The method according to claim 20, wherein the aberrant receptor is an aberrant receptor prepared by expressing in a cell the gene encoding the aberrant receptor.

[Claim 22] The method according to claim 21, wherein the gene encoding the aberrant receptor is an aberrant receptor-encoding gene specified by comparative analysis of a gene prepared from a cell of a mammal suffering from a disease caused by the aberrant receptor, and a gene prepared from a cell of a mammal of the same species that does not carry the aberrant receptor.

[Claim 23] Use of an aberrant gene product obtained by expressing in a cell the gene encoding the aberrant gene product for a screening a substance for treating a disease caused by the product.

[Claim 24] The use according to claim 23, wherein the aberrant gene product is an aberrant receptor.

[Claim 25] Use of an aberrant gene product obtained by expressing in a cell the gene encoding the aberrant gene product for a screening a substance for the aberrant gene product-operating substance.

[Claim 26] The use according to claim 25, wherein the aberrant gene product is an aberrant receptor.

[Detailed description of the invention]

[Technical field to which the invention pertains]

The present invention relates to a screening method for a

substance capable of operating an aberrant gene product and use thereof. More specifically, the present invention relates to a method of creating drugs based on the relationship of a gene and the cause of disease, using information obtained from analysis of structural genes associated with human diseases, e.g., information that serves to elucidate the causal relationship between a gene polymorphism and a disease, and to a use of a substance capable of operating an aberrant gene product prepared on the basis of said new method of pharmaceutical creation.

[Prior art]

Conventional drug screening technology is based mainly on research into the pathologic mechanism of disease in an attempt to explore the feasibility of new drug development from the viewpoint of action mechanisms. This pathologic mechanism represents the outcome, rather than the cause, of pathogenesis. For this reason, even a lead compound obtained from a screening system has often been withdrawn from development due to a failure to obtain the desired clinical effect, clinical manifestation of unexpected toxicity, or another such obstacle. Genome research has drawn attention as a new technology since 1990. The vast genetic information obtained by analytical research into genetic information widely involved in biology and medicine is expected to provide clues to the elucidation of the causal relationship between gene polymorphism and diseases, and to enable the identification and creation of drug based on the cause of pathogenesis.

The process for development of drugs, derived from this genetic information, that act on the cause of pathogenesis, is set forth in the step shown below. Specifically, this drug development strategy comprises:

- determining of the sequence and function of a disease-associated gene,

- determining a gene correlated with the cause of pathogenesis and performing functional analysis of genetic information, and



selecting candidate drugs on the basis of information on the gene that is the cause of pathogenesis.

Presently, the drug creation approach based on genetic information associated with the genome project is in the initial stage of determining the sequence and function of a disease-associated gene, with efforts being undertaken all over the world to elucidate the relationship between diseases and genetic abnormalities.

Although some disease-associated genes have been reported in Alzheimer's disease and hypertension it will take, considerable time will be taken to completely elucidate the pathology of these diseases because various risk factors remain to be clarified. In obesity, the cause of pathogenesis may soon be elucidated; an anti-obesity drug may soon be developed in the near future. In non-insulin-dependent diabetes mellitus, pathogenetic factors for diabetes may soon be demonstrated at the gene level. In heart diseases, a gene associated with myocardial infarction has already been discovered. These and other achievements suggest it very likely that a drug with a new mechanism of action will be found in near future. In cancer research, efforts to discover genes for etiologic or risk factors have steadily yielded good results. It should be noted, however, that different types of cancer involve high diversity such that more findings must be obtained before the cause of pathogenesis of each type is completely clarified.

Most patients with Alzheimer's disease (AD) are solitary cases with unknown hereditary traits. However, there are a small number of cases of familial Alzheimer's disease (FAD) showing autosomal dominant inheritance. The demonstration of the etiologic gene for such FAD would lead to the elucidation of the pathology of solitary AD and subsequent development of a therapeutic drug. Studies regarding the FAD gene have recently been conducted extensively. As a result, it has been shown to date that there is close linkage of the 14th chromosome in many families with early onset FAD, and that there is an abnormality in the  $\beta$  amyloid precursor protein gene, located in the 21st chromosome, in a few

families.

In contrast, for solitary Alzheimer's disease, which accounts for the majority of cases of Alzheimer's disease, or familial tardive Alzheimer's disease, the molecular genetic etiology remained unknown until recent years. In recent years, however, studies have been performed based on the hypothesis that these diseases may be multiple-factor hereditary diseases involved by a number of genetic risk factors. In 1993, Corder et al. reported on APO E4, a polymorphism of the apolipoprotein E gene, as a genetic risk factor for Alzheimer's disease (Science, 261, p. 921, 1993). They analyzed the APOEs in a large number of Alzheimer's disease patients and reported out that APOE4 among those genetic polymorphism for protein is a genetic risk factor. According to their report, the prevalence of APOE4 is significantly higher in the familial delayed Alzheimer's disease patient group than in the normal healthy subject group. Also, dividing Alzheimer's disease patients into 3 groups (those that do not carry APOE4, those carrying APO E4 as a hetero zygote, those carrying APOE4 as a homo zygote) demonstrated that the disease develops at younger ages as the prevalence of APO E4 increases.

Also, active studies are ongoing for risk factors other than APOE4, the genetic polymorphism of the VLDL receptor, an apolipoprotein E receptor.

With respect to obesity, the ob protein has recently been identified (Nature, 372, p. 425, 1994) and it has been reported that there is a feedback circuit in which obesity promotes the expression and secretion of the ob protein in fat cells, which in turn stimulates the hypothalamic satiety center to suppress food intake and to increase energy consumption. A study with a hereditary obesity model mouse, known as the ob/ob mouse, is now being conducted to correlate the ob protein (leptin) to human obesity. In addition, the relationship between obesity and the  $\beta$ 3 adrenaline receptor is also drawing attention. In other words, obesity can develop due to decreased energy consumption, as well as excessive energy intake.

In humans, as well as in rats and mice, excessive food intake

and obesity are thought to potentially stimulate sympathetic nervous system  $\beta_3$  receptor activity to increase energy consumption and cause thermogenesis, especially in brown fat cells etc. This pathway may also be viewed as a feedback mechanism for suppression of the progression of obesity. In cases where such feedback route fails to function due to a congenital anomaly in the  $\beta_3$  receptor, energy consumption is not promoted even by obesity or excessive food intake, resulting in further obesity. In fact, a mutation of the  $\beta_3$  adrenalin receptor by replacement of the 64th Trp residue with an Arg residue has been reported in the Pima Indian tribe which is characterized by high prevalence of obesity and diabetes mellitus [N. Engl. J. Med., 333, p. 343 (1995)]. The same mutation has been identified in people of Caucasian and Finnish descent. This gene mutation, unlike the known gene variations in diabetes mellitus (mutations in the genes for insulin, insulin receptor, glucokinase and mitochondria), is observed at very high frequencies of about 8% in Caucasians and 31% in Pima Indians. Accordingly, it is now recognized that obesity may be a disease caused at the gene level rather than a habitual or cultural problem.

Non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) is known to develop due to an interaction of both genetic and environmental factors. Its pathogenesis is associated with multiple-factor inheritance involving not a single gene but a number of genes. Although such genetic factors remain to be clarified, some candidate genes are known. The elucidation of such risk factors for diabetes mellitus pathogenesis, will assist in early diagnosis, early treatment and prevention of onset of diabetes mellitus and would reduce medical expenses required in case of aggravation of diabetes mellitus with complications, and is therefore strongly demanded desired to reduce medical costs due to this illness.

Candidate genes that may be profoundly involved in NIDDM include genes that cause insulin secretion anomaly, and genes that cause insulin resistance. Of these genes, those believed to result in anomaly in insulin secretion involve genes for of insulin glucokinase and for mitochondria. Genes involved in skeletal muscle

or liver insulin sensitivity reduction (insulin resistance) that have been identified so far include genes for insulin receptors and for glucokinase, an enzyme is involved in hepatic saccharide uptake. Abnormalities in these genes may be involved in NIDDM.

The causal relationship between glucokinase abnormalities and MODY (maturity-onset diabetes in the young) disease has been extensively studied. Glucokinase is a rate-limiting enzyme for glucose metabolism of pancreatic B cells and hepatocytes. The candidate genes for this enzyme are very interesting in that the pathologic characteristics of NIDDM, i.e., abnormal secretion of insulin and insulin resistance, may be explained by a single gene abnormality. MODY is also an early onset subtype of NIDDM with autosomal dominant inheritance that develops at less than 25 years of age, accompanied by glucokinase mutation, which is assumed to be the cause of the disease.

Separately, the relationship between insulin receptor abnormalities and NIDDM has been studied. The insulin receptor consists of a total of 1,355 amino acid residues; a point mutation has been proven to cause insulin resistance. Insulin receptor abnormalities appear in co-dominant inheritance, in which a phenotype appears even in the case of hetero zygotes, and a slightly stronger phenotype appears in the case of homo zygotes.

In addition to these studies, the association of mitochondrial gene abnormalities and NIDDM has also been studied. These 3 types of gene abnormalities i.e. abnormalities in the genes of a glucokinase, insulin receptor and mitochondria, can be viewed as cause of diabetes mellitus because each causes a particular subtype of diabetes mellitus by a single gene abnormality. However, the 83 adrenaline receptor, described above, cannot be recognized as an etiologic gene, even though it serves as a strong pathogenetic factor for NIDDM. It appears that the genes for the 83 adrenaline receptor along with some other genes that are involved in the pathogenesis of obesity of NIDDM are the under influence of environmental factors.

It is well known that environmental factors are involved in

the pathogenesis and progression of hypertension. However, in recent years, genetic predispositions to hypertension have been elucidated. With regard to essential hypertension, which reportedly accounts for more than 90% of hypertensive cases, however, more time is necessary to completely elucidate the pathology, although genetic factors associated with its pathogenesis have been demonstrated.

Human hypertension is characterized by multiple-factor inheritance, incomplete penetrance and strong influence from environmental factors. Currently, approaches used for genetic analysis using human populations include (1) linkage analysis using the DNA of a family member, in the case of evident familial diseases, (2) the affected sib-pair method, which uses the DNA of an affected sib-pair, and (3) the association study method. Of these methods, linkage analysis is very useful in the identification of causative genes for special forms of hypertension which show a strong genetic background, while the affected sib-pair method and the association study method are used to analyze genetic risk factors in essential hypertension.

Essential hypertension, which presumably accounts for most hypertensive patients, has not undergone extensive linkage analysis, because DNA collection is difficult over 3 generations due partially to slow pathogenesis. In these circumstances, the affected sib-pair method has recently yielded remarkable results.

In 1992, Jeunemaitre et al. identified 15 variations on the angiotensinogen gene, and using the affected sib-pair method for hypertensive sib-pairs in the State of Utah, USA and in Paris, France, demonstrated significant correlation of the M235T (single-base substitution of the 235th codon from Met to Thr) variation in exon 2 and hypertension (Cell, 71, p. 169, 1992).

This correlation was stronger in severe hypertension cases; the mutation was shown to increase blood angiotensinogen concentrations in humans of the TT genotype, as well as the ACE/DD polymorphic genotype.

A report on the correlation of a point mutation (A1166C) in

the AII1 type receptor gene and hypertension (Hypertension, 24, p. 63, 1994), reports on blood pressure reduction in AT1-R gene knock-out mice and blood pressure elevation in AII2 type receptor gene knock-out mice (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, p. 3521, 1995; Nature, 377, p. 744, 1995) and other published data suggest the genetic involvement of AII aberrant receptor genes in blood pressure regulation in some way.

Moreover, Zee et al. reported that an abnormality in the low-density lipoprotein receptor gene is associated with obesity in hypertensive patients (Biochem. Biophys. Res. Commun., 189, p. 965, 1992), and Hagihara et al. reported the involvement of the GJP (gap junction protein) gene locus in SHR body weight (Hypertens. Res., 18, p. 63, 1995).

Although there have been steady advances in the research into hypertension at the gene level, as stated above, it appears that considerable time is necessary to further clarify the essential etiologic factors therefor because long-term extensive genetic immunological studies must be done.

Factors involved in heart diseases have also been studied at the gene level. A group of researchers at Bringham and Woman's Hospital, Boston, USA reported that they localized 2 genes that suppress myocardial infarction and 1 gene that increases the risk of myocardial infarction (Nature Genetics, 13, p. 429, 1996).

Although many malignant tumors are thought to have a hereditary, hereditary component tumors showing what is called autosomal dominant inheritance develop in a smaller number of cases. There are still only a small number of such tumors that have had their association with chromosomes or genes clarified.

The great majority of cancers are diseases to which mendelian genetics, which is based on variations in single genes, is not applicable, or which do not enable the candidate gene approach for exploration of their cause at the gene level. This does not mean, however, that common cancers are not always solitary or hereditary. Genetic etiologic studies have shown that the relatives of a particular cancer patient have an increased risk of developing of

similar tumors. It is therefore reasonable from the viewpoint of multiple-factor genetics to assume that a number of environmental factors and genetic factors serve as prerequisites for oncogenesis.

As stated above, multiple-factor genetic models are applicable to cancers; in fact, cancers are gene-associated diseases. It has been demonstrated that oncogenesis occurs in multiple steps as a result of synergistic accumulation of a number of abnormalities in cancer genes and cancer suppressor genes.

For colorectal cancer, the multiple-step oncogenesis process has been studied extensively. It is assumed that variations in cancer genes such as Ras activate cell proliferation. In contrast an abnormality in the tumor suppressor gene p53 inactivates the functioning of normal genes, resulting in the failure to control cell proliferation.

A group of researchers at Columbia University, USA has recently succeeded in cloning PTI-1, a gene that promotes cell malignancy from prostatic hypertrophy to prostatic cancer. PTI-1 serves as a switch from benign adenomas to malignant tumors.

This factor is a gene that regulates the translation process to affect translation. It is a 46 kd protein homologous to the polypeptide chain elongation factor EF1a (50 kd). PTI-1 is thought to result from point mutation and deletion in EF1. The study by the same group confirmed PTI-1 expression in 15 of their 16 patients with progressive prostatic cancer.

Although efforts to discover genes for the etiologic or risk factors for various diseases have steadily yielded good results, much information remains to be obtained before the pathogenetic profiles are fully elucidated.

The step of determining the cause of pathogenesis and functional analysis of genetic information subsequent to determining the sequence and function of a disease-associated gene, is an important task for judging whether the abnormality in the gene is an outcome of disease progression or a pathogenetic cause.

However, the information obtained in the previous step (discovery of disease-associated genes) is nothing more than gene

sequence information. There are currently almost no methods to accurately deduce the function of the gene or gene product from this information.

The knock-out / transgenic mouse preparation technology may now be the most feasible approach. In the prior art technology, however, unexpected serious damage to the living body by gene manipulation often results in still-born delivery or neonatal death, which in turn hampers the advance of the study. The knock-out / transgenic mouse preparation technology is expected to make major contributions to the analysis of gene function, provided that there will be further advances.

Although bioinformatics has potential for the clarification of gene function, it is currently in the initial stage of compiling basic information. The speed of gene sequencing has been remarkably increased; the human cDNA sequence has already been disclosed to a fair degree. During the next several years, advances in the analysis of gene function by a large number of universities and genome venture companies are expected, although their efforts will be accompanied by many difficulties. Such quantitative increase in basic information is likely to have synergistic effects to dramatically accelerate the analysis of gene function by bioinformatics after an unknown time point as a powerful tool of functional analysis of genes.

After analysis of the sequence and function of a disease-associated gene, resulting in the identification of the etiologic gene, development of a new pharmaceutical will begin as the third step based on the information obtained from the previous two steps. However, there is no well-established technology for such drug creation.

[Problem to be solved by the invention]

Against this background, there is a need for the establishment of a new technology for identifying and/or creating drugs based on information obtained from analysis of structural genes associated with human diseases that elucidates the causal



relationship between a gene polymorphism and a disease. The present invention provides such a new method of pharmaceutical development, and a new use for a substance capable of operating an aberrant gene product on the basis thereof.

[Means for solving problem]

After extensive investigation in an attempt to resolve the above problems, the present inventor succeeded in cloning the genes for aberrant gene products (aberrant receptors etc.) from cDNA libraries prepared from human cells or commercially available cDNA libraries derived from human cells, and developed the present invention using cells transformed with those genes.

The present invention relates to a method of creating drugs that enables an approach from the cause of pathogenesis, unlike conventional new drug development approach, which is based on the results of pathogenesis, such as the mechanism of pathogenesis and drug action mechanism. Use of the drug creation technology of the present invention enables a drug creation approach totally differing from the conventional approach. The present invention has a major impact on the development of therapeutic drugs for diseases associated with the brain/central nervous system, wherein the naturally occurring ligands are of low molecular weights.

More specifically, the present invention provides:

[1] A pharmaceutical composition for preventing or treating a disease caused by an aberrant gene product, which comprises said aberrant gene product-operating substance;

[2] The pharmaceutical composition according to paragraph [1], wherein the aberrant gene product is an aberrant receptor, an aberrant channel, an aberrant transporter or an aberrant enzyme;

[3] The pharmaceutical composition according to paragraph [1], which is a pharmaceutical composition for preventing or treating a disease caused by an aberrant receptor, which comprises said aberrant receptor-operating substance;

[4] The pharmaceutical composition according to paragraph [3], wherein the disease caused by an aberrant receptor is a disease

caused by substantial reduction in the activity of the signal transduction system of the cell having the aberrant receptor;

[5] The pharmaceutical composition according to paragraph [3], wherein the disease caused by an aberrant receptor is a disease caused by the substantial absence of the action of a natural ligand on the signal transduction system of the cell having the aberrant receptor;

[6] The pharmaceutical composition according to paragraph [3], wherein the disease caused by an aberrant receptor is a disease caused by substantial reduction in the affinity of a natural ligand for the aberrant receptor;

[7] The pharmaceutical composition according to paragraph [5], wherein the signal transduction system is a signal transduction system based on the change in intracellular concentration of a responding substance resulting from the binding of a natural ligand and a receptor;

[8] The pharmaceutical composition according to paragraph [7], wherein the responding substance is cAMP, inositol phosphate(s) or calcium ion;

[9] The pharmaceutical composition according to paragraph [3], wherein the aberrant receptor-operating substance is a substance that operates the normal receptor;

[10] The pharmaceutical composition according to paragraph [3], wherein the aberrant receptor-operating substance is a substance that does not operate the normal receptor;

[11] Use of an aberrant gene product-operating substance for treating a disease caused by said aberrant gene product;

[12] The use according to paragraph [1]0, wherein the aberrant gene product is an aberrant receptor;

[13] A method of screening for an aberrant gene product-operating substance, which comprises bringing an aberrant gene product into contact with a subject substance and assaying the operation activity of said substance on said product;

[14] The screening method according to paragraph [1]3, wherein the aberrant gene product is an aberrant receptor;

[15] The screening method for a substance for treating a disease caused by an aberrant gene product, which comprises bringing an aberrant gene product into contact with a subject substance and assaying the operation activity of said substance on said product;

[16] A method of screening for a drug for substantially operating the transduction system of a cell having an aberrant receptor of a mammal suffering from a disease caused by the aberrant receptor, which comprises bringing the aberrant receptor into contact with a subject substance and assaying the activity of said substance on said receptor

[17] The screening method according to paragraph [1]5, wherein the aberrant receptor is an aberrant receptor prepared by expressing in a cell the gene encoding the aberrant receptor;

[18] The screening method according to paragraph [1]7, wherein the gene encoding the aberrant receptor is an aberrant receptor-encoding gene specified by comparative analysis of a gene prepared from a cell of a mammal suffering from a disease caused by the aberrant receptor, and a gene prepared from a cell of a mammal of the same species that does not carry the aberrant receptor;

[19] A method of preparing a drug for treating a disease caused by an aberrant gene product, which comprises bringing the aberrant gene product into contact with a subject substance, assaying the activity of said substance on said product and preparing a substance judged to substantially operate the signal transduction system of a cell having the aberrant gene product;

[20] A method of preparing a substance for treating a disease caused by an aberrant receptor, which comprises bringing the aberrant receptor into contact with a subject substance, assaying the activity of said substance on the aberrant receptor and preparing a substance judged to substantially operate the signal transduction system of a cell having the aberrant receptor;

[21] The method according to paragraph [20], wherein the aberrant receptor is an aberrant receptor prepared by expressing in a cell the gene encoding the aberrant receptor;

[22] The method according to paragraph [21], wherein the gene

encoding the aberrant receptor is an aberrant receptor-encoding gene specified by comparative analysis of a gene prepared from a cell of a mammal suffering from a disease caused by the aberrant receptor, and a gene prepared from a cell of a mammal of the same species that does not carry the aberrant receptor;

[23] Use of an aberrant gene product obtained by expressing in a cell the gene encoding the aberrant gene product for a screening a substance for treating a disease caused by the product;

[24] The use according to paragraph [23], wherein the aberrant gene product is an aberrant receptor;

[25] Use of an aberrant gene product obtained by expressing in a cell the gene encoding the aberrant gene product for a screening a substance for the aberrant gene product-operating substance; and

[26] The use according to paragraph [25], wherein the aberrant gene product is an aberrant receptor.

The term "aberrant gene product" as used herein includes, but is not limited to aberrant receptors, aberrant channels, aberrant transporters and aberrant enzymes. The term "aberrant" above means a mutant in the structural gene corresponding to a gene product, particularly a mutant that has occurred naturally in vivo, which mutant can cause a disease due to the fact that the reactivity of a substance that operates the normal gene product (e.g., the ligand that operates the normal receptor, such as a natural ligand present in vivo) differs from the reactivity of said substance which the normal gene product. Also, it is preferable that the aberrant gene product and the normal gene product are capable of similar of function, i.e., after a substance against the aberrant gene product results in the aberrant gene product acting normally, the aberrant gene product should exhibit a response (e.g., change in intracellular concentration of responding substance in the signal transduction system of cells having the normal receptor) similar to that exhibited by the normal gene product after being operated

Diseases caused by aberrant gene products include, but are not limited to Alzheimer's disease (e.g., familial Alzheimer's disease, solitary Alzheimer's disease), schizophrenia, depression,

hypertension (e.g., essential hypertension), obesity, diabetes mellitus (e.g., non-insulin-dependent diabetes mellitus), heart diseases (e.g., myocardial infarction), cancers (e.g., colorectal cancer, prostatic cancer), rheumatism, allergic diseases (e.g., atopy) and arteriosclerosis, with preference given to Alzheimer's disease, schizophrenia, depression, hypertension, obesity, diabetes mellitus, cancers etc.

The term "aberrant receptor" as used herein is understood to include receptors with a mutation in the structural gene thereof in vivo, resulting in substantially changed affinity for substances such as the natural ligand (e.g., reduction, enhancement etc., preferably reduction), particularly receptors that cause a disease due to the substantial change in the affinity of said natural ligand. The term "substantial change" as used above means a change to the extent that a disease can be caused when the affinity of the natural ligand for the normal and aberrant receptors are compared, and may be any change, whether significant or insignificant, as long as it is capable of causing a disease. Also, it is preferable that the aberrant receptor and the normal receptor be capable of similar function, i.e., after an operating substance against the aberrant receptor results in the aberrant receptor acting normally, the aberrant receptor should exhibit a response (e.g., change in intracellular concentration of responding substance in the signal transduction system of cells having the normal receptor) similar to that product by the normal receptor after being operated by a natural ligand thereagainst. It is preferable that the signal transduction system of cells having the aberrant receptor be identical to that of cells having the normal receptor. In other words, if the affinity of the natural ligand has been substantially decreased due to a mutation in the receptor gene, even if the cells having the aberrant receptor have the same signal transduction system as that of cells having the normal receptor, the signal transduction system of the cells having the aberrant receptor substantially will fail to function, which can cause a disease. However, according to the present methods, the use of an agonist

for the aberrant receptor that binds to the aberrant receptor and which is capable of operating the signal transduction system of the cells having the aberrant receptor would enable the effective prevention or treatment of such a disease.

The disease caused by an aberrant receptor may be any disease, as long as it is caused by a substantial change in the affinity of the natural ligand. Such diseases include diseases caused by substantial reduction in the affinity of the natural ligand for the receptor, diseases caused by substantial failure of the natural ligand to operate the signal transduction system of the cells having the aberrant receptor, diseases caused by substantial reduction in the activity of the transfer system of the cells having the aberrant receptor and diseases caused by aberrant signaling or excessive signaling in the signal transduction system of the cells having the aberrant receptor. More specifically, such diseases include Alzheimer's disease (e.g., familial Alzheimer's disease, solitary Alzheimer's disease), schizophrenia, depression, hypertension (e.g., essential hypertension), obesity, diabetes mellitus (e.g., non-insulin-dependent diabetes mellitus), heart diseases (e.g., myocardial infarction), cancers (e.g., colorectal cancer, prostatic cancer), rheumatism, allergic diseases (e.g., atopy) and arteriosclerosis, with preference given to Alzheimer's disease, schizophrenia, depression, hypertension, obesity, diabetes mellitus, cancers etc.

Substances capable of operating an aberrant receptor include agonist and antagonists to the aberrant receptor etc. These substances are used as appropriate for the target disease. For example, in diseases caused by substantial reduction in the affinity of the natural ligand for the receptor, diseases caused by substantial failure of the natural ligand to operate the signal transduction system of the cells having the aberrant receptor, diseases caused by substantial reduction in the activity of the transfer system of the cells having the aberrant receptor, and other such diseases, aberrant receptor agonists are preferably used. In diseases caused by abnormal signaling or excessive signaling in

the signal transduction system of the cells having the aberrant receptor, and other such diseases, aberrant receptor antagonists are preferably used. Also, the aberrant receptor-operating substance may be a substance that operates the normal receptor or a substance that does not operate the normal receptor, selected depending on the target disease, with preference given to a substance that substantially fails to operate the normal receptor.

Such signal transduction systems include those based on a change in intracellular concentrations of responding substances (e.g., cAMP, inositol phosphate, calcium ion) formed by the binding of a natural ligand and a receptor.

The term "aberrant channel" as used herein is understood to include channels with a mutation in the structural gene thereof, resulting in substantially changed affinity of substances (e.g. blockers, openers) that operate the normal channel, with preference given to channels that cause a disease due to the substantial change in the affinity of said operator. Also, it is preferable that the aberrant channel and the normal channel be capable of similar of function, i.e., after an operating substance against the aberrant channel results in the aberrant channel acting normally, the aberrant channel should exhibit a response (e.g., gate closure or opening) similar to that exhibited by the normal channel after being operated by an operating substance thereagainst. Diseases caused by aberrant enzymes include Alzheimer's disease (e.g., familial Alzheimer's disease, solitary Alzheimer's disease), schizophrenia, depression, hypertension (e.g., essential hypertension), obesity, diabetes mellitus (e.g., non-insulin-dependent diabetes mellitus), heart diseases (e.g., myocardial infarction), cancers (e.g., colorectal cancer, prostatic cancer), rheumatism, allergic diseases (e.g., atopy) and arteriosclerosis, with preference given to Alzheimer's disease, schizophrenia, depression, hypertension, obesity, diabetes mellitus, cancers etc.

The term "aberrant transporter" as used herein is understood to include transporters with a mutation in the structural gene thereof, resulting in substantially changed affinity of substances

that operate the normal transporter (e.g., substances that promote or inhibit the signal transduction by transporters), with preference given to transporters that cause a disease due to the substantial change in the affinity of said operating substance. Also, it is preferable that the aberrant transporter and the normal transporter be capable of similar of function, i.e., after an operating substance against the aberrant transporter is used on the aberrant transporter, the aberrant transporter exhibits a response similar to that exhibited (e.g., transportation of ions, nutrients etc.) by the normal transporter after being operated by an operating substance thereagainst.

Diseases caused by aberrant transporters include Alzheimer's disease (e.g., familial Alzheimer's disease, solitary Alzheimer's disease), schizophrenia, depression, hypertension (e.g., essential hypertension), obesity, diabetes mellitus (e.g., non-insulin-dependent diabetes mellitus), heart diseases (e.g., myocardial infarction), cancers (e.g., colorectal cancer, prostatic cancer), rheumatism, allergic diseases (e.g., atopy) and arteriosclerosis, with preference given to Alzheimer's disease, schizophrenia, depression, hypertension, obesity, diabetes mellitus, cancers etc.

The term "aberrant enzyme" as used herein is understood to include enzymes with a mutation in the structural gene thereof, resulting in substantially changed affinity to substances (e.g., activators, inhibitors) that operate the normal enzyme, with preference given to enzymes that cause a disease due to the substantial change in the affinity of said operating substance. Also, it is preferable that the aberrant enzyme and the normal enzyme be capable of similar of function, i.e., after an operating substance against the aberrant enzyme is used on the aberrant enzyme, the aberrant enzyme should exhibit a response (e.g., substrate protein activation) similar to that exhibited by the normal enzyme after being operated by an operating substance thereagainst.

Diseases caused by aberrant enzymes include Alzheimer's disease (e.g., familial Alzheimer's disease, solitary Alzheimer's



disease), schizophrenia, depression, hypertension (e.g., essential hypertension), obesity, diabetes mellitus (e.g., non-insulin-dependent diabetes mellitus), heart diseases (e.g., myocardial infarction), cancers (e.g., colorectal cancer, prostatic cancer), rheumatism, allergic diseases (e.g., atopy) and arteriosclerosis, with preference given to Alzheimer's disease, schizophrenia, depression, hypertension, obesity, diabetes mellitus, cancers etc.

Identification of the gene encoding an aberrant gene product (e.g., aberrant receptor) can be achieved by comparing genes prepared from a cell of a mammal (e.g., rats, rabbits, sheep, pigs, bovines, cats, dogs, monkeys, humans, preferably humans) suffering from a disease caused by the aberrant gene product, and genes prepared from a cell of a mammal of the same species that does not have the disease and therefore, does not carry the aberrant gene product.

An aberrant gene identified as a disease-causing gene by analyzing of the sequence and function of the gene (e.g., genes encoding aberrant gene products derived from human cells, preferably genes encoding aberrant receptors derived from human cells, etc.) can, for example, be prepared by the method described below.

First, the RNA encoding an aberrant gene product is prepared from a cell of an animal species from which said gene product is derived (e.g., human cells), preferably cells of animals suffering from a disease caused by the aberrant gene product. Available methods of preparing RNA from such materials include the guanidine thiocyanate method [J. W. Chirgwin et al., Biochemistry, Vol. 18, p. 5,294 (1979)].

After an oligo-dT primer or random oligonucleotide is added to the RNA thus obtained, cDNA can be synthesized in the presence of reverse transcriptase. PCR can be carried out in the presence of a sense primer and antisense primer, both for amplification of the cDNA of an aberrant gene product from a standard cDNA preparation obtained on the basis of a published sequence or analytically

identified sequence of said product, PCR can be carried out, as directed in the instruction manual for a commercially available kit (e.g., produced by Cetus/Perkin-Elmer). The amplified cDNA can be separated by a commonly known method, e.g., agarose electrophoresis, and then recovered from the gel. The base sequence of this cDNA can be determined by the dideoxynucleotide synthetic chain termination method [T. Messing et al., Nucl. Acids Res., Vol. 9, p. 309 (1981)].

The plasmid having the cloned cDNA can be used as such, or after being cleaved with an appropriate restriction enzyme and inserted into another vector as desired.

Any vector can be used, as long as it enables replication in the host. When the host is a bacterium of the genus *Escherichia* (e.g. *Escherichia coli*), such vectors include *Escherichia coli*-derived plasmids, e.g., pBR322 [F. Bolivar et al., Gene, Vol. 2, p. 95 (1979)], pBR325, pUC12 and pUC13. When the host is a yeast, such vectors include yeast-derived plasmids, e.g., pSH19 (S. Harashima et al., Mol. Cell. Biol., Vol. 4, p. 771, (1984)] and pSH19-1 (European Patent Application Publication EP-A-0235430). When the host is an animal cell, such vectors include, for example, pSV2-X [R. C. Mulligan and P. Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, p. 2072 (1981)], which results from SV40 ori insertion into pBR322, and pcD-X [H. Okayama and P. Berg, Mol. Cell. Biol., Vol. 3, p. 280 (1983)]. When the host is an insect cell, such vectors include, for example, the Baculovirus transfer vectors pVL1392 and pVL1393 [manual (MAXBAC<sup>TM</sup> Baculovirus expression system, Manual version 1.4) supplied by the manufacturer (Invitrogen Corporation, CA, USA)].

The cloned cDNA may have the translation initiation codon (ATG) at the 5'-terminal thereof and the translation termination codon (TAG, TGA or TAA) at the 3'-terminal thereof. To enhance the expression of said cDNA, it is preferable that the promoter sequence be joined upstream and operably linked thereto.

Any promoter can be used for the present invention, as long as it is appropriate for the host used to express the desired gene.

When the host is *Escherichia coli*, such promoters include the T7 promoter, trp promoter, tac promoter, lac promoter and APL promoter, with preference given to the T7 promoter. When the host is a yeast, such promoters include the GAPDH promoter, PGK promoter, PHO5 promoter and ADH promoter, with preference given to the GAPDH promoter. When the host is an animal cell, such promoters include the SV40-derived promoter, retrovirus promoter and human cytomegalovirus promoter. When the host is an insect cell, such promoters include the polyhedrin promoter of nuclear polyhedrosis virus.

A promoter can be prepared from the corresponding gene. It can also be chemically synthesized. The expression vector may contain a signal sequence, pre-pro sequence etc., which may be selected from known signals, as long as they function in the host.

Using the thus-constructed DNA-containing recombinant expression plasmid, a transformant is produced.

Hosts include, for example, bacteria of the genus *Escherichia*, yeasts, animal cells and insect cells. Bacteria of the genus *Escherichia* include *Escherichia coli* K12 DH1 [B. Low, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 60, p. 160 (1968)], C600 [R. K. Appleyard, Genetics, Vol. 39, p. 440 (1954)], MM294 [K. Backman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 73, p. 4,174 (1976)] and N4830 [M. E. Gottesman et al., J. Mol. Biol., Vol. 140, p. 57 (1980)]. Yeasts include, for example, *Saccharomyces cerevisiae* AH22R<sup>-</sup> [A. Miyanohara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 80, p. 1 (1983)], NA87-11A, DKD-5D, NA74-3A and NA74-3Ap<sup>-</sup> [Y. Kaisho et al., Yeast, Vol. 5, p. 91 (1989)] and *Saccharomyces pombe* ATCC38399 (h-leul-32) and TH168 (h90 ade6-M210 ural leul) [M. Kishida and C. Shimada, Current Genetics, Vol. 10, p. 443 (1986)]. Animal cells include, for example, simian COS-7 cells, simian Vero cells, Chinese hamster ovarian (CHO) cells, mouse L cells, human FL cells, which are all adhesion cells, and mouse myeloma cells (Sp2/0 cells etc.), mouse YAC-1 cells, mouse MethA cells, mouse P388 cells and mouse EL-4 cells, which are all suspension cells. Insect cells include Sf9 cells.

Bacteria of the genus *Escherichia* can be transformed in accordance with the method described by T. Maniatis et al. [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 249 (1982)], for instance. Yeasts can be transformed in accordance with the method described by A. Hinnen (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, p. 1929 (1978)), for instance. Animal cells can be transformed in accordance with the method described by M. Wigler et al. in Cell, Vol. 14, p. 725 (1978), for instance. Insect cells can be transformed in accordance with the manual (MAXBAC(TM) Baculovirus expression system, Manual version 1.4) supplied by the manufacturer (Invitrogen Corporation).

The transformant thus obtained is cultured by a commonly known method.

Media preferably used to cultivate a transformant whose host is a bacterium of the genus *Escherichia* include, for example, the M9 medium containing glucose and casamino acid [J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, p. 431, Cold Spring Harbor Laboratory (1972)]. To increase promoter efficiency as necessary, a chemical agent such as isopropyl thiogalactoside (IPTG) or indolyl-3-acrylic acid may be added. Cultivation is normally carried out at about 15 to 43° C. for about 3 to 24 hours, with aeration and/or stirring as necessary.

Media for cultivating a transformant whose host is a yeast include, for example, Burkholder's minimal medium [K. L. Bostian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, p. 4504 (1980)]. It is preferable that the medium be adjusted to pH about 5 to 8. Cultivation is normally carried out at about 20 to 35° C. for about 24 to 72 hours, with aeration and/or stirring as necessary.

Media for cultivating a transformant whose host is an animal cell include, for example, MEM medium containing about 5 to 20% fetal bovine serum [H. Eagle, Science, Vol. 130, p. 432 (1959)], DMEM medium [R. Dulbecco and G. Freeman, Virology, Vol. 8, p. 396 (1959)], RPMI-1640 medium [G. E. More et al., Journal of the American Medical Association, Vol. 199, p. 519 (1967)], 199 medium [J. F. Morgan et al., Proceedings of the Society for Experimental Biology

and Medicine, Vol. 73, p. 1 (1950)] and ASF104 medium (Ajinomoto). Cultivation is normally carried out at about 30 to 40°C. for about 15 to 60 hours, with aeration and/or stirring as necessary.

Media for cultivating a transformant whose host is an insect cell include, for example, TNM-FH medium [W. F. Hink et al., Nature, Vol. 226, p. 466 (1990)]. Cultivation is normally carried out at about 15 to 30°C. for about 24 to 72 hours, with aeration and/or stirring as necessary.

According to the present invention, an expression product (aberrant gene product such as an aberrant receptor) can be isolated by appropriate combinations of commonly known methods of separation and purification. Such known methods of separation and purification include those based on solubility differences, such as salting-out and solvent precipitation; those based mainly on molecular weight differences, such as dialysis, ultrafiltration, gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE); those based on charge differences, such as ion exchange chromatography; those based on specific affinity, such as affinity chromatography; those based on hydrophobicity differences, such as reverse-phase high performance liquid chromatography; and those based on isoelectric point differences, such as isoelectric focusing.

By expressing an aberrant genetic product by gene engineering technology using *Escherichia coli*, a cultured animal cell, a cultured insect cell etc., the desired product can be produced at high purity and in large amounts.

When the thus-obtained aberrant gene product is in free form, it can be converted to a salt by known methods or a method based thereon. When the aberrant gene product is obtained in salt form, it can be converted to free form or another salt by a commonly known method or a method based thereon.

Also, it is possible to express an aberrant gene product (e.g., aberrant receptor of humans etc.) in a eukaryotic cell using the product's cDNA, and use the aberrant gene product obtained to search for a compound that operates it. Alternatively, by using the gene encoding a specified aberrant gene product as a DNA probe, the mRNA

content in the aberrant gene product expressed in vivo can be determined by the Northern blotting method. Moreover, it is possible to prepare an antibody against said aberrant gene product, and quantify said product in vivo by in situ hybridization.

This aberrant gene product can be used for screening for a substance capable of operating an aberrant gene product, screening for drugs for treatment of diseases caused by aberrant gene products (e.g., screening for drugs for operating the transfer system of a cell having an aberrant receptor of a mammal suffering from a disease caused by the aberrant receptor) and for other purposes, and is especially useful for screening for agonists or antagonists for disease-associated aberrant receptors in warm-blooded animals such as humans.

The above screening is hereinafter described more specifically.

The above-described aberrant gene product is useful in searching for an operating substance thereof. In other words, it enables the provision of a screening method for a substance capable of operating an aberrant gene product, wherein said product is brought into contact with a subject substance to determine the effect of the subject substance on the aberrant gene product.

Useful subject compound include known ligands, synthetic compounds, peptides, proteins etc., as well as tissue extracts and cell culture supernatants of warm-blooded mammals (e.g., mice, rats, pigs, bovines, sheep, monkeys, humans). For example, such a tissue extract, cell culture supernatant, or the like, may be added to the above-described aberrant gene product, followed by fractionation with monitoring of operation activity etc., to finally yield a single operating substance.

Specifically, the screening method is exemplified by the method in which substances (e.g., peptides, proteins, non-peptide compounds, synthetic compounds, fermentation products) having operational activity on said product are tested by constructing an expression system for an aberrant gene product (e.g., aberrant receptor) and adding the subject substance to the expression system.

In screening for an operating substance for an aberrant receptor, in particular, it is preferable that an aberrant receptor prepared by expressing in a cell the gene encoding the aberrant receptor be used.

More specifically, the present invention provides a screening method for a substance capable of operating an aberrant gene product, characterized in that:

(1) the amount of labeled subject substance bound to an aberrant gene product (e.g., aberrant receptor) is determined when the labeled substance is brought into contact with said product;

(2) the amount of labeled subject substance bound to cells containing an aberrant gene product (e.g., aberrant receptor) or a membrane fraction of said cells is determined when the labeled subject substance is brought into contact with said cells or the membrane fraction thereof;

(3) the amount of labeled subject substance bound to an aberrant gene product (e.g., aberrant receptor) is determined when the labeled subject substance is brought into contact with said product expressed on the cell membrane of a transformant containing DNA encoding the product by culturing said transformant;

(4) a cell-stimulating activity (e.g., growth promotion, promotion or suppression of intracellular protein phosphorylation) via an aberrant gene product (e.g., aberrant receptor) is used to assay the operation activity of a subject substance when said substance is brought into contact with cells containing said product; or

(5) a cell-stimulating activity (e.g., growth promotion, promotion or suppression of intracellular protein phosphorylation) via an aberrant gene product (e.g., aberrant receptor) is used to assay the operation activity of a subject substance when said substance is brought into contact with the aberrant gene product as expressed on the cell membrane of a transformant containing DNA encoding the abnormal gene product by culturing said transformant; and combination thereof.

Labeled subject substances include substances labeled with

[<sup>3</sup>H], [<sup>125</sup>I], [<sup>14</sup>C], [<sup>135</sup>S] or other radioisotopes.

Example procedures for screening for a substance capable of operating an aberrant gene product are hereinafter described.

First, a standard aberrant receptor preparation is prepared by suspending cells containing the aberrant receptor or the membrane fraction thereof in an appropriate buffer. Any buffer can be used, as long as it does not interfere with subject substance-aberrant receptor binding. Such buffers include phosphate buffers and Tris-HCl buffers of pH about 4-10 (preferably pH 6-8). For the purpose of reducing non-specific binding, surfactants such as CHAPS, Tween-80 (trade name) (Kao-Atlas), digitonin and deoxycholate, and various proteins such as bovine serum albumin and gelatin, may be added to the buffer. Also, for the purpose of inhibiting degradation of the receptor and subject substance by protease, protease inhibitors such as PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride), leupeptin, E-64 (produced by Peptide Institute, Inc.) and pepstatin may be added. To 0.01 ml to 10 ml of said receptor solution, a subject substance labeled with a given amount (5,000 cpm to 500,000 cpm) of [<sup>3</sup>H], [<sup>125</sup>I], [<sup>14</sup>C] or the like is added. To determine the amount of non-specific binding (NSB), a reaction tube containing an unlabeled subject substance in excess is also provided. Reaction is carried out at 0° C to 50° C, preferably 4° C to 37° C for 20 minutes to 24 hours, preferably 30 minutes to 3 hours. After completion of the reaction, the reaction mixture is filtered through glass fiber filter paper etc. and washed with an appropriate amount of the same buffer, after which the residual radioactivity in the glass fiber filter is measured using a liquid scintillation counter or γ-counter. A subject substance yielding the radioactivity above 0 cpm in count (B-NSB) obtained by subtracting nonspecific binding (NSB) from total binding (B) may be selected as a ligand for the aberrant receptor.

To assess the operation activity of a subject substance on an aberrant receptor, cells containing the aberrant receptor are first cultured on multiwell plates etc. Prior to agonist assay, the medium is replaced with fresh medium or an appropriate buffer



that is non-toxic to the cells, followed by incubation in the presence of a subject substance. for a given period of time, after which cells are extracted or the supernatant is recovered, and the resulting product is quantified by a method appropriate thereto. When it is difficult to detect the production of the cell-stimulating activity index substance due to a degradation enzyme contained in the cells, an inhibitor against said degradation enzyme may be added before assay. The operation activity of the subject substance can be assessed by measuring an activity via an aberrant gene product (e.g., growth promotion, promotion or suppression of intracellular protein phosphorylation), or the change in the responding substance concentration in the intracellular signal transduction system (e.g. cAMP, inositol phosphate, calcium ion, or the like), when a subject substance is brought into contact with cells containing said product, or by measuring an activity (e.g., growth promotion, promotion or suppression of intracellular protein phosphorylation) via an aberrant gene product, or the change in responding substance concentration in the intracellular signal transduction system (e.g. cAMP, inositol phosphate, calcium ion, or the like), when a subject substance is brought into contact with said aberrant receptor expressed on the cell membrane of a transformant containing DNA encoding the aberrant receptor by culturing said transformant.

Also, the present invention provides a method of creating a drug for treatment of a disease caused by an aberrant gene product, wherein the method comprises bringing the aberrant gene product (e.g., aberrant receptor) is into contact with a subject substance, assessing the operation activity of said substance on said product, and preparing a drug judged to substantially operate the aberrant gene product. The present invention also provides a method of preparing a drug for treatment of a disease caused by an aberrant gene product, wherein the method comprises bringing an aberrant receptor into contact with a subject substance assessing the operation activity of said substance on said aberrant receptor, and preparing a drug judged to substantially operate the signal

transduction system of a cell containing the aberrant receptor. Thus, a new method of pharmaceutical development or preparation is established based on information obtained from analysis of structural genes associated with human diseases, which serves to elucidate the causal relationship between a gene mutation and a disease. The drug thus created can, for example, be used orally in the form of tablets, capsules, elixirs, microcapsules etc., all of which may be sugar coated as necessary, or non-orally in the form of injectable preparations such as aseptic solutions and suspensions in water or other pharmaceutically acceptable liquids. Also, the desired prophylactic/therapeutic agent can be produced by mixing the drug thus obtained with physiologically acceptable carriers, flavoring agents, excipients, vehicles, antiseptics, stabilizers, binders etc. in unit dosage forms for generally accepted manners of pharmaceutical making.

Additives which can be mixed in tablets, capsules etc. include, for example, binders such as gelatin, corn starch, tragacanth and gum arabic, excipients such as crystalline cellulose, swelling agents such as corn starch, gelatin and alginic acid, lubricants such as magnesium stearate, sweetening agents such as sucrose, lactose and saccharin, and flavoring agents such as peppermint, and cherry. When the unit dosage form is the capsule, the above-mentioned materials may further incorporate liquid carriers such as oils and fats. Sterile compositions for injection can be formulated by ordinary methods of pharmaceutical making such as by dissolving or suspending active ingredients, naturally occurring vegetable oils such as sesame oil and coconut oil, etc. in vehicles such as water for injection. Aqueous liquids for injection include physiological saline and isotonic solutions containing glucose and other auxiliary agents (e.g., D-sorbitol, D-mannitol, sodium chloride), and may be used in combination with appropriate dissolution aids such as alcohols (e.g., ethanol), polyalcohols (e.g., propylene glycol, polyethylene glycol), nonionic surfactants (e.g., polysorbate 80 (trade name), HCO-50) etc. Oily liquids include sesame oil and soybean oil, and may be used in

combination with dissolution aids such as benzyl benzoate and benzyl alcohol.

The aqueous liquid may also be formulated with buffers (e.g., phosphate buffer, sodium acetate buffer), soothing agents (e.g., benzalkonium chloride, procaine hydrochloride), stabilizers (e.g., human serum albumin, polyethylene glycol), preservatives (e.g., benzyl alcohol, phenol), antioxidants etc. The thus-prepared injectable liquid is normally filled in an appropriate ampule. Because the thus-obtained preparation is effective even at low doses, and therefore safe and of low toxicity, it can be administered to warm-blooded mammals (e.g., rats, rabbits, sheep, pigs, bovines, cats, dogs, monkeys, humans), for instance. The dose is normally about 0.1 mg to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, and more preferably about 1.0 to 20 mg per day for an adult (weighing 60 kg) in oral administration as a therapeutic agent for hypertension, depending on target disease, symptoms etc. In non-oral administration, it is advantageous to administer the drug in the form of injectable preparation at a daily dose of about 0.01 to 30 mg, preferably about 0.1 to 20 mg, and more preferably about 0.1 to 10 mg per administration for an adult (weighing 60 kg), depending on subject of administration, target organ, symptoms, method of administration etc. For other animal species, corresponding doses as converted per 60 kg weight can be administered.

Furthermore, the present invention provides a use of a substance capable of operating an aberrant gene product for treatment of a disease caused by said aberrant gene product (e.g., aberrant receptor), a use of an aberrant gene product obtained by expressing in a cell the gene encoding the aberrant gene product (e.g., aberrant receptor) for screening for a substance for treatment of a disease caused by said product, a use of an aberrant gene product obtained by expressing in a cell the gene encoding the aberrant gene product (e.g., aberrant receptor) for screening for an operating substance for said product, etc.

DNA: Deoxyribonucleic acid

A: Adenine  
T: Thymine  
G: Guanine  
C: Cytosine  
SDS: Sodium dodecyl sulfate  
Gly: Glycine (G)  
Ala: Alanine (A)  
Val: Valine (V)  
Leu: Leucine (L)  
Ile: Isoleucine (I)  
Ser: Serine (S)  
Thr: Threonine (T)  
Cys: Cysteine (C)  
[1/2] Cys: Half-cystine  
Met: Methionine (M)  
Glu: Glutamic acid (E)  
Asp: Aspartic acid (D)  
Lys: Lysine (K)  
Arg: Arginine (R)  
His: Histidine (H)  
Phe: Phenylalanine (F)  
Tyr: Tyrosine (Y)  
Trp: Tryptophan (W)  
Pro: Proline (P)  
Asn: Asparagine (N)  
Gln: Glutamine (Q)  
Apr: Ampicillin resistance gene  
Ter: Tetracycline resistance gene

The present invention is hereinafter described in more detail by means of the following examples, which only serve for exemplification and are not to be construed as limitative to the present invention.

#### EXAMPLE 1

##### Cloning of Human B3 Adrenergic Receptor cDNA

To amplify human  $\beta_3$  adrenergic receptor cDNA by the PCR method, the following two primers (Nos. 1 and 2) were synthesized, with reference to a known nucleotide sequence of the human  $\beta_3$  adrenergic receptor [J. M. Lelias et al., FEBS Lett., Vol. 324, p. 127 (1993)].

Sense primer No. 1:

5'-ATTTGGGAGACCCCCTCCTTCCTTCTTTCC-3' (SEQ ID NO:1)

Antisense primer No. 2:

5'-ACAGAGTTGTTGCTTCTTGTCCTTCAGGCC-3' (SEQ ID NO:2)

Using Takara Ex Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) and the included buffer, the following PCR reaction was carried out. Using 0.5  $\mu$ l of a human fat cell-derived cDNA library (CLONTECH Laboratories, Inc.) as the template, 5  $\mu$ l of the attached PCR reaction buffer (10 fold diluted), 4  $\mu$ l of a dNTP mixture, 0.5  $\mu$ l (2.5 U) of TaKaRa Ex Taq, and each of 2 kinds of primers (combinations of primer No. 1 above and the  $\lambda$ gt 11 forward primer (Takara Shuzo Co., Ltd.) and of primer No. 1 above and the [ $\lambda$ gt11 reverse primer (Takara Shuzo Co., Ltd.); each 100 pmol) were added to a tube and diluted to 50  $\mu$ l with sterile distilled water. A PCR reaction was carried out at 94°C for 2 minutes, 61°C for 1 minute and 72°C for 1 minute in 25 cycles; the 2 tubes were mixed; to 5  $\mu$ l of this reaction mixture, 2 primers (Nos. 1 and 2 above; each 100 pmol) were added, followed by a PCR reaction at 94°C for 2 minutes, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute in 30 cycles. When the PCR product was separated by 1% agarose gel electrophoresis, an amplified DNA fragment was confirmed at a position corresponding to the size (1310 bp) expected from the nucleotide sequence of the human  $\beta_3$  adrenergic receptor. This DNA fragment was recovered from the agarose gel and inserted into the SmaI site of the plasmid vector pUC19 (Takara Shuzo Co., Ltd.) to yield p19-h  $\beta_3$ R. The nucleotide sequence of the cDNA was determined by the dideoxynucleotide synthetic chain termination method [T. Messing et al., Nucl. Acids Res., Vol. 9, p. 309 (1981)] and confirmed as identical to the published sequence.

## EXAMPLE 2

Preparation of Human  $\beta_3$  Adrenergic Receptor Mutant (Trp64Arg)

## DNA

A synthetic oligonucleotide for mutagenesis was synthesized, and a mutant was generated using the Mutan-Super Express Km (Takara Shuzo Co., Ltd.) as follows:

Oligonucleotide for mutagenesis No. 3:

5'-TGGCCATCGCCCGGACTCCGAG-3' (SEQ ID NO:3)

A DNA fragment obtained by digestion of the plasmid p19-hB3R described in Example 1 with restriction enzymes EcoRI and XbaI was recovered from agarose gel and inserted between the EcoRI and XbaI sites of the plasmid vector pKF18k attached to the kit (Takara Shuzo Co., Ltd.) to yield p18k-hB3R. Using 10 ng of this DNA as the template, in the presence of 5 pmol of the attached selection primer, 5 pmol of No. 5 primer above, 5 µl of a reaction buffer (10 fold diluted), 4 µl of a dNTP mixture, and 0.5 µl (2.5 U) of TaKaRa LA Taq, diluted to 50 µl with sterile distilled water, a PCR reaction was carried out at 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 3 minutes in 25 cycles, followed by DNA recovery by ethanol precipitation. This DNA was distilled in 5 µl of sterile distilled water; using 2 µl of this solution, the DNA was introduced into the attached *Escherichia coli* MV1184 strain to yield transformants capable of growing on kanamycin-containing (50 µg/ml) LB plates. Of these transformants, several clones were subjected to nucleotide sequencing at the mutation site; a clone confirmed as having the mutation introduced was designated p18k-hB3(W64R)R.

## EXAMPLE 3

Preparation of Recombinant DNA for Expression of the Human B3 Adrenergic Receptor Gene in Animal Cells

After the plasmid p19-hB3R described in Example 1 was digested with EcoRI and XbaI, a human B3 adrenergic receptor cDNA fragment was recovered from agarose gel. Next, the above-described cDNA fragment was inserted between the EcoRI and XbaI sites of pME18S [R. Sasada et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 190, p. 1,173 (1993)], a vector for transient expression in animal cells, to yield the expression plasmid pB3R201. Next, to select a cell

line showing stable expression, the neomycin resistance gene (neo), a drug resistance marker, was inserted, as described below. First, a fragment consisting of the SV40 early promoter, the neo gene and the SV40 polyadenylation signal was inserted between the KpnI and SspI sites of the plasmid phB3R201 to yield the plasmid phB3R203.

After the plasmid p18k-hB3(W64R)R described in Example 2 was digested with EcoRI and XbaI, a human B3 adrenaline receptor variant cDNA fragment was recovered from agarose gel. Following the same procedures as those shown above, the plasmids ph B3(W64R)R201 and phB3(W64R)R203 were prepared.

#### EXAMPLE 4

##### Expression of the Human B3 Adrenergic Receptor Gene in Animal Cells

The plasmids described in Example 3 (phB3R203 and phB3(W64R)R203) were each introduced into CHO cells (Chinese hamster ovary cells) using the Mammalian Transfection Kit (STRATAGENE, CA, USA) as follows:

To an 80 cm<sup>2</sup> flask, 15 ml of a complete medium [Ham F-12 medium containing 10% (v/v) FCS (fetal calf serum) (LIFE TECHNOLOGIES, INC.)] was added, and  $5 \times 10^5$  CHO cells were seeded. After overnight cultivation in the presence of 5% carbon dioxide at 37°C, this culture medium was replaced with 10 ml of the above medium. After sterile water was added to 30 µg of the plasmid described in Example 1 (phB3R203) to make 450 ml, 50 µl of solution #1, then 500 µl of solution #2, both included in the kit, were mixed in the 450 ml. After this mixture was kept standing at room temperature for 15 minutes, 1 ml aliquot was added drop by drop onto, and mixed with, the cells, followed by overnight cultivation in the presence of 3% carbon dioxide at 37°C. On the following day, the medium was removed; after the cell surface was washed with F-12 medium (serum-free), 15 ml of a complete medium (10% FCS/F-12) was added, followed by overnight cultivation in the presence of 5% carbon dioxide at 37°C. On the following day, the above cells were seeded at about 200 cells per well to a 12-well plate supplemented with

a D-MEM-F-12 medium (Nikken Seibutsu Igaku Kenkyujo) containing 10% FCS, followed by overnight cultivation, after which the cells were further cultured in a medium containing 400 µg/ml G418 (LIFE TECHNOLOGIES, INC.) (10% FCS/D-MEM/F-12) until colony formation was noted, with medium replacement every 3 to 4 days. After a large number of colonies were found to form, 1 to several colonies per well were seeded to, and cultured on, a 24-well plate supplemented with a 10% FCS/D-MEM/F-12 medium containing 400 µg/ml G418 (2 ml/well), and G418-resistant cells were harvested (primary cloning). Next, for 2 to 3 wells of the cells harvested in the primary cloning, 10 colonies per well were sown to, and cultured on, a 24-well plate in the presence of G418 at an increased concentration of 800 µg/ml, and G418-resistant cells were harvested. Out of these cells, a line showing high expression of the human 83 adrenergic receptor was selected by the method described in Example 5 below (secondary cloning).

#### EXAMPLE 5

Determination of cAMP Activity in Cells Showing Expression of a Human 83 Adrenergic Receptor

cAMP production activity was determined using the cAMP ELA SYSTEM (Amersham, UK) as follows:

Each of the culture media of cells showing expression of a human 83 adrenergic receptor obtained on a 24-well plate in Example 4 (CHO/phB3R203 and CHO/phB3(W64R)R203) was replaced with a G418-free medium (10% FCS/D-MEM/F-12); 0.5 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, Wako Pure Chemical Industries) was added. After cultivation in the presence of 5% carbon dioxide at 37°C. for 30 minutes, 10<sup>-5</sup> isoproterenol [(+)-isoproterenol, Funakoshi] was added, followed by further cultivation for 30 minutes. Next, the cell surface was three times washed with 4°C. PBS (phosphate-buffered saline); 300 µl of 0.1 N hydrochloric acid was added, followed by boiling at 95°C for 10 minutes. A 25 µl aliquot was collected from each well and dissolved in 75 µl of the assay buffer attached to the kit. After a 50 µl aliquot of the solution,



together with 100  $\mu$ l of an anti-cAMP rabbit antibody, was added to each well of the kit component 96-well microtiter plate with an anti-rabbit IgG donkey antibody immobilized thereon, the plate was kept standing at 4°C for 1 hour. Next, 100  $\mu$ l of HRP-labeled cAMP was added; after the plate was kept standing at 4°C. for 1 hour, each well was washed 4 times, followed by the addition of 150  $\mu$ l of TMB (3,3,5,5-tetramethylbenzidine); after the plate was kept standing at room temperature for 60 minutes, 100  $\mu$ l of 1.0 N sulfuric acid was added to each well, followed by absorptiometry at 450 nm wavelength. A cell line showing increased cAMP production activity in the presence of isoproterenol, a  $\beta$  adrenergic receptor agonist, was selected.

#### EXAMPLE 6

##### Determination of Ligand Binding Activity of a Mutant Human $\beta_3$ Adrenergic Receptor

A line of Chinese hamster ovary (CHO) cells having the Trp64Arg variant human  $\beta_3$  adrenergic receptor expressed therein were prepared for use in the search for compounds that specifically bind to the Trp64Arg variant human  $\beta_3$  adrenaline receptor. After being three times washed with an ice-cooled phosphate buffer, the CHO cells having the Trp64Arg variant human  $\beta_3$  adrenergic receptor expressed therein were immersed in an ice-cooled hypotonic solution (1 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2) for 10 minutes; these after the cells were detached, followed by centrifugation at 4°C and 18,000 rpm for 15 minutes and recovery of the cell membrane fraction, which contained said receptor. After TME buffer (75 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, 12.5 mM magnesium chloride, 1.5 mM EDTA, 4  $\mu$ M desipramine, 5  $\mu$ g/ml leupeptine, 1  $\mu$ g/ml benzamidine, 5  $\mu$ g/ml trypsin inhibitor and 40  $\mu$ g/ml basitlacine) was added, the cell membrane fraction obtained was uniformly suspended using a 25 gauge injection needle to yield a standard receptor preparation. The standard receptor preparation prepared (containing 10 to 30  $\mu$ g, based on protein), [ $^{125}$ I]-iodocyanopindrole (240 pM, DuPont-NEN, USA) and the subject compound were mixed; after adjustment to a final volume of 250  $\mu$ l

with TME buffer, the mixture was kept standing at room temperature for 90 minutes. The mixture was aspirated and filtered using a glass fiber filter (GF/B, Packard Instrument Co., Inc., USA) and a cell harvester (Filter Mate Cell Harvester, Packard Instrument Co., Inc., USA); the radioactivity in the filter was determined using a scintillation counter (TopCount Microplate Scintillation Counter, Packard Instrument Co., Inc., USA). Non-specific binding was quantified in the presence of (S)-(-)-propranolol (Sigma, USA) added to a final concentration of 100  $\mu$ M.

#### EXAMPLE 7

##### Determination of cAMP-Increasing Activity in CHO Cells Expressing a Mutant Human B3 Adrenergic Receptor

A line of Chinese hamster ovary (CHO) cells having the Trp64Arg variant human B3 adrenergic receptor expressed therein were seeded to a 96-well microtiter plate ( $1 \times 10^4$  cells/well); after 72 hours of cultivation following confluence, the subject compound was added; the plate was kept standing at 37°C for 40 minutes (100  $\mu$ l/well). After the cells were thrice washed with 4°C phosphate buffer, 0.1 N hydrochloric acid was added, followed by boiling at 95°C for 10 minutes. A 25  $\mu$ l aliquot was collected from each well and dissolved in 75  $\mu$ l of the assay buffer attached to the cAMP EIA SYSTEM (Amersham, UK); a 50  $\mu$ l sample was taken from the solution and quantified using the above cAMP EIA SYSTEM, as described below. After the above sample (50  $\mu$ l) and 100  $\mu$ l of an anti-cAMP rabbit antibody were added to a 96-well microtiter plate with an anti-rabbit IgG donkey antibody immobilized thereon, the plate was kept standing at 4°C for 2 hours; after 100  $\mu$ l of horse radish peroxidase (HRP)-labeled cAMP was added, the plate was kept standing at 4°C for 1 hour. After each well was aspirated, the plate was washed 4 times with a washing solution (400  $\mu$ l/well). Next, 150  $\mu$ l of tetramethylbenzidine, an HRP substrate, was added to each well, followed by 60 minutes of incubation during shaking at room temperature. Finally, 100  $\mu$ l of 1.0 N sulfuric acid was added to stop the reaction, after which cAMP was quantified by absorptiometry

at 450 nm wavelength. The results obtained demonstrated that the cAMP concentration in CHO cells increased depending on the concentration of compound added, and that the increase was significant in comparison within the absence of the compound.

#### EXAMPLE 8

##### Compound Screening

According to compound screening in accordance with the method of Example 6, a compound showing high affinity for the Trp64Arg variant human B3 adrenergic receptor was obtained. Testing said compound in accordance with the method of Example 7 revealed that the cAMP concentration in CHO cells showing expression of the Trp64Arg variant human B3 adrenergic receptor increase with its concentration.

#### [SEQUENCE LISTING]

SEQ ID NO: 1

SEQUENCE LENGTH:30

SEQUENCE TYPE:Nucleic acid

STRANDEDNESS:Single

SEQUENCE CLASS:Sense

SEQUENCE:ACAGAGTTGT TGCTTCTTGT CCTTCAGGCC

SEQ ID NO: 2

SEQUENCE LENGTH:30

SEQUENCE TYPE:Nucleic acid

STRANDEDNESS:Single

SEQUENCE TYPE:Antisense

SEQUENCE:ACAGAGTTGT TGCTTCTTGT CCTTCAGGCC

SEQ ID NO: 3

SEQUENCE LENGTH:22

SEQUENCE TYPE:Nucleic acid

STRANDEDNESS:Single

SEQUENCE TYPE:Sense

SEQUENCE:TGGCCATCGC CCGGACTCCG AG

[Document] Abstract

[Abstract]

[Problem] To provide uses for a substance capable of operating an aberrant gene product, which is prepared by a new drug creation technology that focuses on the cause of disease using information of finding out causal association of mutation of gene and diseases, information obtained from analysis of structural genes associated with diseases.

[Means for solving] (1) A pharmaceutical composition for preventing or treating a disease caused by an aberrant gene product, which comprises said aberrant gene product-operating substance; (2) Use of an aberrant gene product-operating substance for treating a disease caused by said aberrant gene product; (3) A method of screening for an aberrant gene product-operating substance, which comprises bringing an aberrant gene product into contact with a subject substance and assaying the operation activity of said substance on said product; and (4) A method of preparing a drug for treating a disease caused by an aberrant gene product, which comprises bringing the aberrant gene product into contact with a subject substance, assaying the activity of said substance on said product and preparing a substance judged to substantially operate the aberrant gene product.

[Selected Drawings] No

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
る事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1 9 9 7 年 4 月 2 日

出 願 番 号  
Application Number:

平成 9 年特許願第 0 8 3 7 5 8 号

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
country code and number  
of our priority application,  
as used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

J P 1 9 9 7 - 0 8 3 7 5 8

願 人  
Applicant(s):

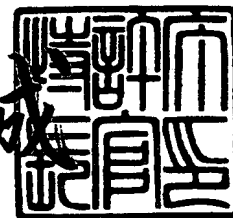
武田薬品工業株式会社

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 6 年 6 月 2 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

中 嶋 誠



出証番号 出証特 2 0 0 6 - 3 0 4 5 7 4 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 A97061

【提出日】 平成 9年 4月 2日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 35/00

【発明の名称】 異常遺伝子産物作動物質の用途およびスクリーニング方法

【請求項の数】 26

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県宝塚市雲雀丘 2 丁目 1 0 番 7 号

    【氏名】 藤野 政彦

【特許出願人】

    【識別番号】 000002934

    【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

    【代表者】 武田 國男

【代理人】

    【識別番号】 100073955

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

    【識別番号】 100077012

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 岩谷 龍

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 005142

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000052

【包括委任状番号】 9000053

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 異常遺伝子産物作動物質の用途およびスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 異常遺伝子産物作動物質を含有してなる、該産物に起因する疾患の予防・治療剤。

【請求項 2】 異常遺伝子産物が、異常受容体、異常チャンネル、異常トランスポーターまたは異常酵素である請求項 1 記載の予防・治療剤。

【請求項 3】 異常受容体作動物質を含有してなる、異常受容体に起因する疾患の予防・治療剤である請求項 1 記載の予防・治療剤。

【請求項 4】 異常受容体に起因する疾患が、異常受容体を有する細胞の伝達系が実質的に低下することに起因する疾患である請求項 3 記載の予防・治療剤。

【請求項 5】 異常受容体に起因する疾患が、異常受容体を有する細胞の伝達系を天然リガンドが実質的に作動しないことに起因する疾患である請求項 3 記載の予防・治療剤。

【請求項 6】 異常受容体に起因する疾患が、天然リガンドの異常受容体に対する親和性が実質的に低下することに起因する疾患である請求項 3 記載の予防・治療剤。

【請求項 7】 伝達系が、天然リガンドと受容体との結合により生じる応答物質の細胞内濃度変化に基づく伝達系である請求項 5 記載の予防・治療剤。

【請求項 8】 応答物質が c A M P、イノシトールリン酸またはカルシウムイオンである請求項 7 記載の予防・治療剤。

【請求項 9】 異常受容体作動物質が、正常受容体を作動する物質である請求項 3 記載の予防・治療剤。

【請求項 1 0】 異常受容体作動物質が、正常受容体を作動しない物質である請求項 3 記載の予防・治療剤。

【請求項 1 1】 異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための、該産物作動物質の用途。



【請求項 12】 異常遺伝子産物が、異常受容体である請求項 10 記載の用途。

【請求項 13】 異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング方法。

【請求項 14】 異常遺伝子産物が、異常受容体である請求項 13 記載のスクリーニング方法。

【請求項 15】 異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための物質のスクリーニング方法。

【請求項 16】 異常受容体と被検物質とを接触させ、異常受容体に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の異常受容体を有する細胞の伝達系を実質的に作動させるための薬物のスクリーニング方法。

【請求項 17】 異常受容体が、異常受容体をコードする遺伝子を細胞で発現させることにより調製された異常受容体である請求項 15 記載のスクリーニング方法。

【請求項 18】 異常受容体をコードする遺伝子が、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の細胞から調製された遺伝子と、異常受容体を保持しない同種の哺乳動物の細胞から調製された遺伝子とを比較解析することにより特定された異常受容体をコードする遺伝子である請求項 17 記載のスクリーニング方法。

【請求項 19】 異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定し、異常遺伝子産物を実質的に作動すると判定される薬物を調製することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための薬物を調製する方法。

【請求項 20】 異常受容体と被検物質とを接触させ、異常受容体に対する該物質の作動性を検定し、異常受容体を有する細胞の伝達系を実質的に作動すると判定される物質を調製することを特徴とする、異常受容体に起因する疾患の治療のための物質を調製する方法。

【請求項 2 1】異常受容体が、異常受容体をコードする遺伝子を細胞で発現させることにより調製された異常受容体である請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】異常受容体をコードする遺伝子が、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の細胞から調製された遺伝子と、異常受容体を保持しない同種の哺乳動物の細胞から調製された遺伝子とを比較解析することにより特定された異常受容体をコードする遺伝子である請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】異常遺伝子産物をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物に起因する疾患の治療のための物質をスクリーニングするための用途。

【請求項 2 4】異常遺伝子産物が、異常受容体である請求項 2 3 記載の用途。

【請求項 2 5】異常遺伝子産物をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物作動物質をスクリーニングするための用途。

【請求項 2 6】異常遺伝子産物が、異常受容体である請求項 2 5 記載の用途。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は異常遺伝子産物作動物質の用途およびスクリーニング方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒト疾患に関連する構造遺伝子の解析から得られる情報、例えば遺伝子変異と疾患との因果関係を解明する情報などを用いて、従来とは全く異なるアプローチ、即ち「疾患原因からの創薬アプローチ」をはじめて可能にさせる新規創薬技術に関し、また、このような新規医薬品創製法に基づき調製される異常遺伝子産物作動物質の用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来の創薬技術は、主として疾患の病態メカニズムを研究し、作用機序から新薬開発の可能性を検討するものであった。この病態メカニズムとは、病態発症の結果であり、その原因ではなかった。そのため、スクリーニング系から得られたリード化合物も、その後期待したほどの臨床効果が得られなかったり、予想外の毒性が臨床で発現することなどにより、開発が中断されることがしばしばあった

。一方、自然科学分野の新技术として、1990年以降ゲノム研究が注目されている。これは広く生物・医学全般にかかわる遺伝子情報の解析研究であり、このゲノム研究により得られる膨大な遺伝子情報は、遺伝子変異と疾病との因果関係を解明する糸口を提供し、「疾患発症の原因からの創薬法」を可能にすると期待されているためである。

遺伝子情報に由来し、疾病発症原因に作用する薬剤の開発は、次のステップで進められる。すなわち、

- ・ 疾病関連遺伝子の配列と機能の同定
- ・ 疾病発症原因遺伝子の決定、遺伝子情報の機能解析
- ・ 疾病発症原因遺伝子情報に由来する候補薬物の選出

という新しい理論的創薬アプローチである。

現在、ゲノムプロジェクトに関連した遺伝子情報に由来した創薬アプローチは、まだ最も初期の段階、「疾病関連遺伝子の配列と機能の同定」のステップにあり、疾病と遺伝子異常の関係を解明する努力が世界中で行われている。

### 【0003】

アルツハイマー病、高血圧症では、いくつかの疾患関連遺伝子が報告されているが、さまざまな危険因子の解明が待たれ、全容解明にはまだかなりの時間を要する。肥満では、病態発症原因の解明に近づいており、近い将来に抗肥満薬が開発される可能性は高い。インスリン非依存型糖尿病では、近い時期に糖尿病の発症因子が遺伝子レベルで明らかにされるであろう。心臓疾患では、心筋梗塞に関する遺伝子発見などがあり、新しい作用機作を持つ薬剤が近い将来見いだされる可能性は高い。ガンでは、疾病の原因または危険因子の遺伝子発見の努力は、着実に成果を挙げている。しかし、種々のガンは多様性に富み、それぞれの発症原因の全体像が明らかになるには、まだ多くの知見が必要であるのも現実である。

### 【0004】

アルツハイマー病（AD）のほとんどの症例は、遺伝性のはっきりしない孤発例である。しかしながら、少数の常染色体優性遺伝を示す家族性のAD（familial Alzheimer's disease: FAD）例が存在する。このFADの病因遺伝子が明らかにされれば、孤発性のADの病態の解明、さらにその先にある治療薬の開発に結びつくと

考えられ、近年FAD遺伝子に関する研究が活発に行われている。そうした結果、現在までのところ、早期発症型FADの多くの家系では第14染色体が強く連鎖しており、少数の家系では第21染色体に存在する $\beta$ アミロイド前駆体タンパク質遺伝子に異常のあることが解明された。

これに対して、アルツハイマー病の大多数を占める弧発性アルツハイマー病、あるいは家族性の晩期発症型アルツハイマー病については、最近まで分子遺伝学的な病因は明らかにはされていなかった。しかし、近年これらの疾病は、複数の遺伝学的なリスクファクターが関与する多因子遺伝病ではないかとの立場からの研究が注目を集めている。1993年Corderらによって、アポリポタンパク質E遺伝子多型の一つであるAPOE4が、アルツハイマー病の遺伝的な危険因子として報告された(*Science*, 261, p921, 1993)。彼らは多数のアルツハイマー病患者のAPOEの解析をおこない、これらのタンパク質の遺伝子多型のうちAPOE4が遺伝学的なリスクファクターであると指摘した。彼らの報告によると、家族性の遅発型アルツハイマー病患者群ではAPOE4の頻度が健常者群と比較して、有意に高い。また、アルツハイマー病群をAPOE4を持たない群、APOE4をヘテロ接合体で持つ群、APOE4をホモ接合体で持つ群の3群に分けると、APOE4をより多く持つ群で発症年齢がより若年化していることが明らかにされた。

また、APOE4以外の危険因子として、アポリポタンパク質EのレセプターであるVLDLレセプターの遺伝子多型についても積極的な研究が進められている。

#### 【0005】

肥満に関しては、最近obタンパク質が同定され(*Nature*, 372, p425, 1994)、肥満すると脂肪細胞でのobタンパク質の発現や分泌が亢進し、それが視床下部の満腹中枢を刺激して摂食の抑制、エネルギー消費を抑えるというネガティブフィードバック回路が存在することが判明した。現在ob/obマウスと呼ばれる遺伝性の肥満モデルマウスによる研究が精力的に進められており、このobタンパク質(レプチン、Leptin)がヒトの肥満にどれだけ関与しているのか研究されている。さらに、肥満と $\beta$ 3アドレナリンレセプターの関係も注目を集めている。即ち、肥満はエネルギー摂取の過剰とともにエネルギー消費の低下によっても生じる。

ラット、マウスだけでなくヒトでも、過食や肥満によって交感神経系の  $\beta 3$  レセプターの活性が刺激され、特に褐色脂肪細胞などでのエネルギー消費が増大し、熱産生を起こす可能性があると考えられている。この経路は肥満の進行を抑制するフィードバックメカニズムとも捉えられる。そのため、 $\beta 3$  レセプターに先天的な異常があってこのようなフィードバックループが働かない場合には、肥満あるいは過食によってもエネルギー消費が亢進せず、肥満が助長される結果になる。実際、 $\beta 3$  アドレナリンレセプターの64番目のTrp残基がArg残基に変わっているという変異がピマインディアンと呼ばれる肥満と糖尿病の多発する民族で報告されている[N. Engl. J. Med., 333, 343, (1995)]。さらに、フィンランド人、白人でも同じ変異が同定されている。この変異はこれまで知られている糖尿病における遺伝子変異（インスリン、インスリンレセプター、グルコキナーゼ、ミトコンドリアの各遺伝子変異）と異なり、大変高頻度で、白人で約8%、ピマインディアンで31%にこの遺伝子変異が観察されている。このように、肥満は単なる習慣、文化の問題であるといった概念から、遺伝子レベルに起因して起こる疾病であるといった認識が形成されてきた。

#### 【0006】

インスリン非依存型糖尿病(NIDDM)については、遺伝因子と環境因子の相互作用によって発症することが知られている。そしてこの遺伝因子は必ずしも単一の遺伝子ではなく、複数の遺伝子が発症に関係している多因子遺伝によるものである。現状では、まだ遺伝因子の実態は明らかではないが、いくつかの候補遺伝子の存在が知られている。こうした糖尿病発症のリスクファクターを解明し、糖尿病の早期診断、早期治療、さらに発症予防につなげていくことができれば、糖尿病が重症化し、合併症を併発した時に要する医療費を削減することにもつながり、医療経済的な立場からも大いに望まれることになる。

NIDDMに深く関与している候補遺伝子として考えられているのは、インスリン分泌の異常を起こす遺伝子、インスリン抵抗性を起こす遺伝子などが考えられる。この中でインスリン分泌に関与する遺伝子としては、インスリングルコキナーゼ、ミトコンドリアの遺伝子異常などがある。そして、骨格筋、肝臓のインスリン感受性の低下（インスリン抵抗性）に関与する遺伝子としては、インスリンレ

セプター、肝臓における糖取り込みに関与するグルコキナーゼの遺伝子異常などが同定されてきている。

グルコキナーゼの異常と、MODY (Maturity-Onset Diabetes in the Young) 症の因果関係については詳細な研究がおこなわれている。グルコキナーゼは膵臓 B 細胞および肝臓でのブドウ糖代謝の律速酵素で、1 つの遺伝子異常によってインスリンの分泌異常とインスリン抵抗性という NIDDM の病態を説明することができる大変興味深い候補遺伝子である。MODY は常染色体優性遺伝を示す 25 歳未満で発症する NIDDM の早期発症のサブタイプであり、グルコキナーゼの突然変異が認められ、これが原因であると結論されている。

また、これとは別に、インスリンレセプターの異常と NIDDM の関係についても研究が進められている。インスリンレセプターは全部で 1355 のアミノ酸残基から構成されており、その点突然変異がインスリン抵抗症を発症する原因になっていることが判明している。インスリンレセプター異常の場合はヘテロ接合体でも表現系として現れ、また、ホモ接合体になるともう少し強い表現系が現れてくる、co-dominant (共優性) という遺伝形式をとる。

これら以外にもミトコンドリア遺伝子異常と NIDDM の関連性についても研究がおこなわれているが、これら 3 つの遺伝子異常はそれぞれ単一の遺伝子異常により糖尿病の特別なサブタイプを引き起こすという意味での糖尿病遺伝子であるといえることができる。しかし、肥満症の項で述べた  $\beta 3$  アドレナリンレセプターは NIDDM の強力な発症因子ではあるが、病因遺伝子であるとは言えない。あくまでこの因子は他の遺伝子とともに、環境因子の影響を受けながら肥満あるいは NIDDM の発症に関与しているものと思われる。

#### 【 0 0 0 7 】

高血圧症の発症・進展に環境因子が関与することは広く知られているが、最近になって、遺伝性素因についても解明されるようになってきた。しかし、高血圧症の 9 0 % 以上といわれる本態性高血圧症に関しては、発症に関連する遺伝因子が徐々にわかってきた程度で、病態全体を解明するためにはなお時間がかかる。

ヒト高血圧症の特徴として、多因子遺伝性、不完全浸透率、環境因子の影響が大きいことなどがあげられる。現在行われているヒト集団を用いた遺伝子解析の

手法としては、(1) 明らかに家族性の場合、家系構成員のDNAを用いて行う連鎖解析 (linkage analysis)、(2) 病気の兄弟、姉妹のDNAだけを用いて行う罹患同胞対法 (affected sub-pair method)、(3) 関連の検出 (association study) 法などがある。この中で、連鎖解析は遺伝的背景の強い特殊な形の高血圧症の原因遺伝子同定に威力を発揮し、罹患同胞対法や関連の検出法は、本態性高血圧症の遺伝危険因子解析に用いられている。

こうした中で、ほとんどの患者の原因として考えられる本態性高血圧症は、発症が遅いこともあり、3世代にわたってDNA採取することが難しく、大規模な連鎖解析は行われていない。このような状況で、最近非常に効果を上げているのが罹患同胞対法である。

1992年Jeunemaitreらは、アンジオテンシノーゲン遺伝子上に15カ所の変異を同定し、アメリカ、ユタ州とパリの罹患同胞対法 (高血圧症の兄弟・姉妹) を用いて、エクソン2に存在するM235T (235番のコドンがMetからThrに変化する1塩基置換) 変異と高血圧症とが優位に相関することを示した (Cell, 71, p169, 1992)。

この相関は、重症高血圧症においてより強く認められ、ACE/DD遺伝子多型と同様にTT遺伝子型のヒトのアンジオテンシノーゲン血中濃度を増加させる変異であることが明らかにされた。

AII1型レセプター遺伝子のpoint mutation (A1166C) が、高血圧と相関する報告 (Hypertension, 24, p63, 1994) や、AT1-R遺伝子knock-out mouseで血圧降下、AII2型レセプター遺伝子knock-out mouseで血圧上昇を認めたという報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, p3521, 1995; Nature, 377, p744, 1995) などより、AIIレセプター遺伝子も何らかの形で血圧調整に遺伝的に関与していることが示唆される。

さらに、Zeeらは低密度リポタンパク質レセプター遺伝子の異常が高血圧症患者の肥満に関係することを報告し (Biochem. Biophys. Res. Commun., 189, p965, 1992)、また、荻原らもSHRの体重にGJP (gap junction protein) 遺伝子座位が関与することを報告している (Hypertens. Res., 18, p63, 1995)。

このように高血圧症についての遺伝子レベルでの研究は着実に進んでいるが、

その本質的な病因因子を解明するためには、長期間にわたる大規模な遺伝免疫学も必要とされるので、まだかなりの時間は要するものと思われる。

#### 【0008】

心臓疾病因子の遺伝子レベルの研究も盛んにおこなわれており、米国Brigham and Woman's Hospitalのグループは、心筋梗塞を抑制する2つの遺伝子と、リスクを高める遺伝子1つの染色体上での存在位置を特定したと報告している(Nature Genetics, 13, p429, 1996)。

遺伝性が高いと考えられる悪性腫瘍ではあるが、いわゆる常染色体性優性形式を示す遺伝性腫瘍は、一般的なガンに比較すると症例が限られており、染色体や遺伝子との関連が解明されているもので数十種類知られているだけである。

ガンの大多数は、単一遺伝子の変異に基づくMendel性遺伝形式に当てはまらない、あるいはその原因を遺伝子レベルで探ろうとした場合、候補遺伝子アプローチを採用することのできない疾病であると言える。しかしながら、このことは、一般的なガンが必ずしも弧発性、あるいは遺伝性ではないということを意味しているのではない。遺伝疫学的な研究からは特定のガン患者の近親者では類似した腫瘍が発生する危険性が高いことが知られている。すなわち、多因子遺伝学的な立場から、複数の環境因子や遺伝因子がガンを発症させるための条件になっていると考えるのが妥当である。

このように多因子遺伝モデルが適応されるガンではあるが、やはりガンは遺伝子の病気であり、発ガンはガン遺伝子やガン抑制遺伝子の異常が複数蓄積し、それが相乗的に多段階にわたって起こっていくことが明らかにされてきた。

大腸ガンについては、その多段階発生過程が詳細に研究されている。Rasなどのガン遺伝子の変異により、細胞の増殖が活発になり、またガン抑制遺伝子p53の異常で正常遺伝子の働きが不活性化され、細胞の増殖をコントロールできなくなっていくと考えられる。

また、最近前立腺肥大症から前立腺ガンへと細胞の悪性化を進行させる遺伝子として、PTI-1のクローニングに米国コロンビア大学のグループが成功した。PTI-1は良性な腺種を悪性腫瘍に変化させるスイッチの役割を果たしている。

本因子は翻訳プロセスを調整し、翻訳を異常化する遺伝子である。46kdのタン



パク質でポリペプチド鎖伸長因子EF1a(50kd)と相同性がある。PTI-1はEF1にポイントミューテンションと欠失が生じたものと考えられている。同グループの研究では、進行性前立腺ガン患者16人中、15人でPTI-1の発現を確認している。

#### 【0009】

以上のように、各疾病の原因または危険因子の遺伝子発見の努力は、着実に成果を挙げているものの、疾病発症の全体像が明らかになるには、まだ多くの知見が必要である。

「疾患関連遺伝子の配列と機能の同定」の次のステップである「疾患発症原因遺伝子の決定、遺伝子情報の機能解析」は、その遺伝子の異常が疾病進行の結果生じたものか、それとも発症原因であるかを見極める重要な作業である。

しかし、前ステップでの知見（疾患関連遺伝子の発見）も、その実体は遺伝子配列情報にすぎず、ここから遺伝子の機能もしくは遺伝子産物の機能を正確に類推する方法は、現在のところほとんどない。

ノックアウト・トランスジェニックマウスの作成技術は、現在最も実現可能なアプローチとして挙げられるが、従来の技術レベルでは、遺伝子操作が生体に予期せぬ重大な障害を及ぼす結果、死産もしくは出生直後の死亡により研究が進まない場合も多い。新たな進歩が将来蓄積していけば、ノックアウト・トランスジェニックマウスの作成技術は、遺伝子機能の解析に今後大きく貢献すると考えられる。

バイオインフォマティクスは、遺伝子の機能解明にポテンシャルを持つが、現状では基礎情報を整備している段階と考えられる。遺伝子配列の高速化はめざましく、ヒトcDNA配列はすでに相当なレベルまで解析されている。ここ数年は多くの困難を伴うと予測されるものの、多くの大学、ゲノムベンチャーにより遺伝子の機能解析が進むと予想される。これら基礎情報量の増加が相乗効果をもたらし、バイオインフォマティクスによる遺伝子の機能解析は、今後ある時を境に急激に進む可能性があり、遺伝子機能解析の手段として将来実力を発揮すると予想される。

疾患関連遺伝子の配列と機能を解析し、その結果、疾病原因遺伝子が特定された段階で、第三のステップとしてその情報をもとに新規医薬品の開発が始まる。

しかしその創薬技術については、確立されたものはない。

#### 【0010】

##### 【発明が解決しようとする課題】

以上のような現状から、ヒト疾患関連構造遺伝子の解析から得られる遺伝子変異と疾病との因果関係を解明する情報に基づいて、新たな創薬技術の確立が望まれている。本発明は、このような新規医薬品創製法ならびにこれに基づいて調製される異常遺伝子産物作動物質の新規用途を提供するものである。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意検討した結果、ヒト細胞から調製したcDNAライブラリーあるいは市販のヒト細胞由来のcDNAライブラリーから異常遺伝子産物（異常受容体など）の遺伝子をクローニングし、この遺伝子により形質転換させた細胞を用いて、本発明を完成した。

本発明は、疾患の病態メカニズム・薬剤の作用機序などの発症結果からアプローチする従来の新薬開発とは異なり、発症の原因からの創薬アプローチを可能にさせる創薬技術に関し、本発明の創薬技術を用いることにより、従来とは全く異なる創薬アプローチの方向、すなわち「疾病原因からの創薬アプローチ」に基づいた新規医薬品の創製法が可能になる。特に、天然リガンドが低分子である脳・神経系に関わる疾患の治療薬の創製には重大なインパクトを与えるものである。

#### 【0012】

さらに詳しくは、本発明は、

- (1) 異常遺伝子産物作動物質を含有してなる、該産物に起因する疾患の予防・治療剤；
- (2) 異常遺伝子産物が、異常受容体、異常チャンネル、異常トランスポーターまたは異常酵素である前記(1)記載の予防・治療剤；
- (3) 異常受容体作動物質を含有してなる、異常受容体に起因する疾患の予防・治療剤である前記(1)記載の予防・治療剤；
- (4) 異常受容体に起因する疾患が、異常受容体を有する細胞の伝達系が実質的に低下することに起因する疾患である前記(3)の予防・治療剤；

(5) 異常受容体に起因する疾患が、異常受容体を有する細胞の伝達系を天然リガンドが実質的に作動しないことに起因する疾患である前記(3)記載の予防・治療剤；

(6) 異常受容体に起因する疾患が、天然リガンドの異常受容体に対する親和性が実質的に低下することに起因する疾患である前記(3)記載の予防・治療剤；

(7) 伝達系が、天然リガンドと受容体との結合により生じる応答物質の細胞内濃度変化に基づく伝達系である前記(5)記載の予防・治療剤；

(8) 応答物質が cAMP、イノシトールリン酸またはカルシウムイオンである前記(7)記載の予防・治療剤；

(9) 異常受容体作動物質が、正常受容体を作動する物質である前記(3)記載の予防・治療剤；

(10) 異常受容体作動物質が、正常受容体を作動しない物質である前記(3)記載の予防・治療剤；

(11) 異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための、該産物作動物質の用途；

(12) 異常遺伝子産物が、異常受容体である前記(10)記載の用途；

(13) 異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング方法；

(14) 異常遺伝子産物が、異常受容体である前記(13)記載のスクリーニング方法；

(15) 異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための物質のスクリーニング方法；

(16) 異常受容体と被検物質とを接触させ、異常受容体に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の異常受容体を有する細胞の伝達系を実質的に作動させるための薬物のスクリーニング方法；

(17) 異常受容体が、異常受容体をコードする遺伝子を細胞で発現させること

により調製された異常受容体である前記（15）記載のスクリーニング方法；

（18）異常受容体をコードする遺伝子が、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の細胞から調製された遺伝子と、異常受容体を保持しない同種の哺乳動物の細胞から調製された遺伝子とを比較解析することにより特定された異常受容体をコードする遺伝子である前記（17）記載のスクリーニング方法；

（19）異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定し、異常遺伝子産物を実質的に作動すると判定される薬物を調製することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための薬物を調製する方法；

（20）異常受容体と被検物質とを接触させ、異常受容体に対する該物質の作動性を検定し、異常受容体を有する細胞の伝達系を実質的に作動すると判定される物質を調製することを特徴とする、異常受容体に起因する疾患の治療のための物質を調製する方法；

（21）異常受容体が、異常受容体をコードする遺伝子を細胞で発現させることにより調製された異常受容体である前記（20）記載の方法；

（22）異常受容体をコードする遺伝子が、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の細胞から調製された遺伝子と、異常受容体を保持しない同種の哺乳動物の細胞から調製された遺伝子とを比較解析することにより特定された異常受容体をコードする遺伝子である前記（21）記載の方法；

（23）異常遺伝子産物をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物に起因する疾患の治療のための物質をスクリーニングするための用途；

（24）異常遺伝子産物が、異常受容体である前記（23）記載の用途；

（25）異常遺伝子産物をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物作動物質をスクリーニングするための用途；および

（26）異常遺伝子産物が、異常受容体である前記（25）記載の用途を提供するものである。

### 【0013】

本明細書における「異常遺伝子産物」としては、例えば異常受容体、異常チャ

ンネル、異常トランスポーター、異常酵素などが挙げられる。上記した「異常」とは、遺伝子産物に対応する構造遺伝子の変異、なかでも生体内で自然発生した変異を示し、また、その結果、正常遺伝子産物を作動する物質（例えば、正常受容体を作動するリガンドであり、生体内に存在する天然リガンドなど）の反応性が正常遺伝子産物に対する該物質の反応性とは異なることに起因して疾患を引き起こしうる変異を示す。また、異常遺伝子産物と正常遺伝子産物との機能は同一であること、すなわち異常遺伝子産物に対する作動物質が異常遺伝子産物を作動した後においては、正常遺伝子産物に対する作動物質が正常遺伝子産物を作動した場合に生じるレスポンス（例えば、正常受容体を有する細胞の伝達系における応答物質の細胞内濃度変化など）と同様なレスポンスを示すことが好ましい。

異常遺伝子産物に起因する疾患としては、アルツハイマー病（例、家族性のアルツハイマー病、孤発性のアルツハイマー病など）、精神分裂病、うつ病、高血圧症（例、本態性高血圧症など）、肥満、糖尿病（例、インスリン非依存型糖尿病など）、心臓疾患（例、心筋梗塞など）、ガン（例、大腸ガン、前立腺ガンなど）、リウマチ、アレルギー性疾患（例、アトピーなど）、動脈硬化症などが挙げられるが、なかでも、アルツハイマー病、精神分裂病、うつ病、高血圧症、肥満、糖尿病、ガンなどが好ましい。

#### 【0014】

本明細書における「異常受容体」としては、受容体の構造遺伝子が生体内で変異した結果、天然リガンドの親和性が実質的に変化（例、低下、増強など；好ましくは低下）した受容体が挙げられ、なかでも、天然リガンドの親和性の実質的な変化に起因して疾患を引き起こす受容体が好ましい。ここで「実質的な変化」とは、正常受容体および異常受容体に対する天然リガンドの親和性を比較した場合において、疾患を引き起こしうる程度に変化していることを示し、有意な変化であっても、有意でない変化であっても、疾患を引き起こしうる変化であれば何れでもよい。また、異常受容体と正常受容体との機能は同一であること、すなわち異常受容体に対する作動物質が異常受容体を作動した後においては、正常受容体に対する天然リガンドが正常受容体を作動した場合に生じるレスポンス（例えば、正常受容体を有する細胞の伝達系における応答物質の細胞内濃度変化など）

と同様なレスポンスを示すことが好ましく、異常受容体を有する細胞の伝達系が正常受容体を有する細胞の伝達系と同一であることがさらに好ましい。すなわち、異常受容体を有する細胞が正常受容体を有する細胞と同一の伝達系を有しているにもかかわらず、受容体遺伝子の変異に起因して、天然リガンドの親和性が実質的に低下している場合には、異常受容体を有する細胞の伝達系が実質的に作動しないため、疾患を引き起こす原因となりうるが、異常受容体と結合し、異常受容体を有する細胞の伝達系を作動しうる異常受容体のアゴニストを用いれば、係る疾患を有効に予防または治療することが可能となる。

異常受容体に起因する疾患としては、天然リガンドの受容体に対する親和性が実質的に変化することに起因する疾患であれば何れでもよく、天然リガンドの受容体に対する親和性が実質的に低下することに起因する疾患、異常受容体を有する細胞の伝達系を天然リガンドが実質的に作動しないことに起因する疾患、異常受容体を有する細胞の伝達系が実質的に低下することに起因する疾患、異常受容体を有する細胞の伝達系における異常なシグナルあるいは過剰伝達に起因する疾患などが挙げられる。より具体的には、例えば、アルツハイマー病（例、家族性のアルツハイマー病、孤発性のアルツハイマー病など）、精神分裂病、うつ病、高血圧症（例、本態性高血圧症など）、肥満、糖尿病（例、インスリン非依存型糖尿病など）、心臓疾患（例、心筋梗塞など）、ガン（例、大腸ガン、前立腺ガンなど）、リウマチ、アレルギー性疾患（例、アトピーなど）、動脈硬化症などが挙げられるが、なかでも、アルツハイマー病、精神分裂病、うつ病、高血圧症、肥満、糖尿病、ガンなどが好ましい。

異常受容体作動物質としては、異常受容体のアゴニスト、異常受容体のアンタゴニストなどが挙げられる。これらは、対象となる疾患に応じて、適宜選択して用いられるが、例えば、天然リガンドの受容体に対する親和性が実質的に低下することに起因する疾患、異常受容体を有する細胞の伝達系を天然リガンドが実質的に作動しないことに起因する疾患、異常受容体を有する細胞の伝達系が実質的に低下することに起因する疾患などの疾患においては、異常受容体のアゴニストが好ましく用いられ、異常受容体を有する細胞の伝達系における異常なシグナルあるいは過剰伝達に起因する疾患などにおいては、異常受容体のアンタゴニスト

が好ましく用いられる。また、異常受容体作動物質は、正常受容体を作動する物質、正常受容体を作動しない物質の何れであってもよく、対象となる疾患に応じて、適宜選択して用いられるが、正常受容体を実質的に作動しない物質が好ましく用いられる。

上記した伝達系としては、天然リガンドと受容体との結合により生じる応答物質（例、cAMP、イノシトールリン酸、カルシウムイオンなど）の細胞内濃度変化に基づく伝達系などが挙げられる。

#### 【0015】

本明細書における「異常チャンネル」としては、チャンネルの構造遺伝子の変異した結果、正常チャンネルを作動する物質（例、ブロッカー、オープナーなど）の親和性が実質的に変化したチャンネルが挙げられ、なかでも、該作動物質の親和性の実質的な変化に起因して疾患を引き起こすチャンネルが好ましい。また、異常チャンネルと正常チャンネルとの機能は同一であること、すなわち異常チャンネルに対する作動物質が異常チャンネルを作動した後においては、正常チャンネルに対する作動物質が正常チャンネルを作動した場合に生じるレスポンス（例えば、ゲートの閉鎖または開放など）と同様なレスポンスを示すことが好ましい。異常チャンネルに起因する疾患としては、アルツハイマー病（例、家族性のアルツハイマー病、孤発性のアルツハイマー病など）、精神分裂病、うつ病、高血圧症（例、本態性高血圧症など）、肥満、糖尿病（例、インスリン非依存型糖尿病など）、心臓疾患（例、心筋梗塞など）、ガン（例、大腸ガン、前立腺ガンなど）、リウマチ、アレルギー性疾患（例、アトピーなど）、動脈硬化症などが挙げられるが、なかでも、アルツハイマー病、精神分裂病、うつ病、高血圧症、肥満、糖尿病、ガンなどが好ましい。

#### 【0016】

本明細書における「異常トランスポーター」としては、トランスポーターの構造遺伝子の変異した結果、正常トランスポーターを作動する物質（例、トランスポーターによる輸送を促進または阻害する物質など）の親和性が実質的に変化したトランスポーターが挙げられ、なかでも、該作動物質の親和性の実質的な変化に起因して疾患を引き起こすトランスポーターが好ましい。また、異常トランス

ポーターと正常トランスポーターとの機能は同一であること、すなわち異常トランスポーターに対する作動物質が異常トランスポーターを作動した後においては、正常トランスポーターに対する作動物質が正常トランスポーターを作動した場合に生じるレスポンス（例えば、イオン、栄養素などの輸送など）と同様なレスポンスを示すことが好ましい。

異常トランスポーターに起因する疾患としては、アルツハイマー病（例、家族性のアルツハイマー病、孤発性のアルツハイマー病など）、精神分裂病、うつ病、高血圧症（例、本態性高血圧症など）、肥満、糖尿病（例、インスリン非依存型糖尿病など）、心臓疾患（例、心筋梗塞など）、ガン（例、大腸ガン、前立腺ガンなど）、リウマチ、アレルギー性疾患（例、アトピーなど）、動脈硬化症などが挙げられるが、なかでも、アルツハイマー病、精神分裂病、うつ病、高血圧症、肥満、糖尿病、ガンなどが好ましい。

#### 【 0 0 1 7 】

本明細書における「異常酵素」としては、酵素の構造遺伝子に変異した結果、正常酵素を作動する物質（例、アクティベーター、インヒビターなど）の親和性が実質的に変化した酵素が挙げられ、なかでも、該作動物質の親和性の実質的な変化に起因して疾患を引き起こす酵素が好ましい。また、異常酵素と正常酵素との機能は同一であること、すなわち異常酵素に対する作動物質が異常酵素を作動した後においては、正常酵素に対する作動物質が正常酵素を作動した場合に生じるレスポンス（例えば、基質蛋白質の活性化など）と同様なレスポンスを示すことが好ましい。

異常酵素に起因する疾患としては、アルツハイマー病（例、家族性のアルツハイマー病、孤発性のアルツハイマー病など）、精神分裂病、うつ病、高血圧症（例、本態性高血圧症など）、肥満、糖尿病（例、インスリン非依存型糖尿病など）、心臓疾患（例、心筋梗塞など）、ガン（例、大腸ガン、前立腺ガンなど）、リウマチ、アレルギー性疾患（例、アトピーなど）、動脈硬化症などが挙げられるが、なかでも、アルツハイマー病、精神分裂病、うつ病、高血圧症、肥満、糖尿病、ガンなどが好ましい。



## 【0018】

異常遺伝子産物（例、異常受容体など）をコードする遺伝子を特定するためには、例えば、異常遺伝子産物に罹患した哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど、好ましくは、ヒト）の細胞から調製された遺伝子と、異常遺伝子産物を保持しない同種の哺乳動物の細胞から調製された遺伝子とを比較解析することによって、異常遺伝子産物をコードする遺伝子を調製し、特定することができる。

疾患関連遺伝子の配列と機能を解析し、その結果、疾患原因遺伝子として特定された異常遺伝子（例えば、ヒト細胞由来の異常遺伝子産物をコードする遺伝子など、好ましくはヒト細胞由来の異常受容体をコードする遺伝子など）は、例えば以下の方法により調製することができる。

まず、異常遺伝子産物をコードするRNAは、該遺伝子産物が由来する動物種の細胞（例、ヒト細胞など、好ましくは異常遺伝子産物に起因する疾患に罹患した動物の細胞）から調製される。これらの材料からRNAを調製する方法としては、グアニジン・チオシアネート法 [J. M. Chirgwin ら, バイオケミストリー (Biochemistry), 第18巻, 第5294頁 (1979年)] などが挙げられる。

このようにして得られたRNAにオリゴdTプライマーもしくはランダムオリゴヌクレオチドを添加した後、リバーシ・トランスクリプターゼを加えてcDNAを合成することができる。異常遺伝子産物の既報の配列または解析し特定された配列を基にして、得られたcDNA標品から該産物cDNAを増幅するためのセンスプライマーとアンチセンスプライマーを添加し、市販のキット（例えば、Cetus/Perkin-Elmer社製）のキットの指示書に従ってPCRを行うことができる。増幅されたcDNAを自体公知の方法、たとえばアガロース電気泳動で分離した後、ゲルから回収することができる。このcDNAの塩基配列はジデオキシヌクレオチド合成鎖停止法 [T. Messing ら, ヌクレイック・アッシズ・リサーチ (Nucl. Acids Res.), 第9巻, 第309頁 (1981年)] によって決定することができる。

クローン化されたcDNAを有するプラスミドはそのまま、あるいは所望により適当な制限酵素で切り出して別のベクターに挿入して用いることができる。

ベクターとしては、宿主に対応して複製できるものであれば何れでもよい。宿

主がエシェリキア属菌 (*Escherichia coli*, 大腸菌) の場合には、大腸菌由来のプラスミド、例えばpBR322 [F. Bolivar ら、*ジーン (Gene)*, 第2巻, 第95頁 (1979年)]、pBR325、pUC12、pUC13などが挙げられる。宿主が酵母である場合には、酵母由来プラスミド、例えばpSH19 [S. Harashima ら、*モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.)*, 第4巻, 第771頁 (1984年)]、pSH19-1 (ヨーロッパ特許出願公開 EP-A-0235430) などが挙げられる。宿主が動物細胞の場合には、例えばpBR322にSV40のoriの挿入されたpSV2-X [R. C. Mulligan and P. Berg, *プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)*, 第78巻, 第2072頁 (1981年)]、pcD-X [H. Okayama and P. Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 第3巻, 第280頁 (1983年)] などが挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合には、例えばバキュロウイルス・トランスファーベクター (Baculovirus transfer vector) pVL1392、pVL1393 [製造業者 (Invitrogen Corporation, CA, USA) のマニュアル (MAXBAC™ Baculovirus expression system, Manual version 1.4)] などが挙げられる。

#### 【 0 0 1 9 】

クローン化されたcDNAは5'末端に翻訳開始コドン (ATG) を有し、また3'末端に翻訳終止コドン (TAG, TGAあるいはTAA) を有していてもよい。更に該cDNAを発現させるために、プロモーター配列を上流に接続するのが好ましい。

本発明に用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。宿主が大腸菌である場合には、T7プロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーターなどが挙げられ、とりわけT7プロモーターが好ましい。宿主が酵母である場合には、GAPDHプロモーター、PGKプロモーター、PH05プロモーター、ADHプロモーターなどが挙げられ、とりわけGAPDHプロモーターが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒトサイトメガロウイルスのプロモーターなどが挙げられる。宿主が昆虫細胞である場合、核多角体ウイルスのポリヘドリン (polyhedrin) プロモーターなどが挙げられる。

プロモーターは対応する遺伝子より調製することができる。また、化学合成することもできる。シグナル配列、プレープロ配列などを発現ベクターに含んでもよく、これらは宿主で機能するものであれば何れでもよい。

このようにして構築されたDNAを含有する組換え発現プラスミドを用いて、形質転換体を製造する。

### 【0020】

宿主としては、例えばエシェリキア属菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞などが挙げられる。エシェリキア属菌としては、エシェリキア・コリK12 DH1 [B. Low, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第60巻, 第160頁 (1968年)]、C600 [R. K. Appleyard, ジェネティクス (Genetics), 第39巻, 第440頁 (1954年)]、MM294 [K. Backmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第73巻, 第4174頁 (1976年)]、N4830 [M. E. Gottesman ら、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 第140巻, 第57頁 (1980年)]などが挙げられる。酵母としては、例えばサッカロマイセス・セレビシェ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22 R-[A. Miyanoharaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第80巻, 第1頁 (1983年)]、NA87-11A, DKD-5D, NA74-3A, NA74-3A $\rho^-$  [Y. Kaisho ら、イースト (Yeast), 第5巻, 第91頁 (1989年)] やシゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) ATCC38399 (h-leu1-32), TH168 (h90 ade6-M210 ural leu1) [M. Kishida and C. Shimada, カレント・ジェネティクス (Current Genetics), 第10巻, 第443頁 (1986年)]などが挙げられる。動物細胞としては、例えば付着細胞であるサルCOS-7細胞、サルVero細胞、チャイニーズ・ハムスター卵巣 (CHO) 細胞、マウスL細胞、ヒトFL細胞、及び浮遊細胞であるマウスミエローマ細胞 (Sp2/0細胞など)、マウスYAC-1細胞、マウスMethA細胞、マウスP388細胞、マウスEL-4細胞などが挙げられる。昆虫細胞としては、Sf9細胞などが挙げられる。

エシェリキア属菌を形質転換するには、例えば T. Maniatis ら [モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning), コールド・スプリング・ハーバー研究所 (Cold Spring Harbor Laboratory), 第249頁 (1982年)] が記載した方法に従って行われる。酵母を形質転換するには、例えば A. Hinnen ら [Proc. Nat

l. Acad. Sci. USA, 第75巻, 第1929頁 (1978年) ] が記載した方法に従って行われる。動物細胞を形質転換するには、例えば M. Wigler ら, Cell, 第14巻, 第725頁 (1978年) に記載の方法に従って行われる。昆虫細胞を形質転換するには、製造業者 (Invitrogen Corporation) のマニュアル (MAXBAC<sup>TM</sup> Baculovirus expression system, Manual version 1.4) に従って行われる。

このようにして得られた形質転換体をそれ自体公知の方法で培養する。

#### 【 0 0 2 1 】

宿主がエシェリキア属菌である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [J. H. Miller, エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Experiments in Molecular Genetics), 第431頁, Cold Spring Harbor Laboratory, (1972年) ] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えばイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) やインドリル-3-アクリル酸のような薬剤を加えることができる。培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪はんを加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [K. L. Bostain ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 第77巻, 第4504頁 (1980年) ] などが挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪はんを加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば約5~20%の牛胎仔血清を含むMEM培地 [H. Eagle, サイエンス (Science), 第130巻, 第432頁 (1959年) ]、DMEM培地 [R. Dulbecco and G. Freeman, ヴイロロジー (Virology), 第8巻, 第396頁 (1959年) ]、RPMI-1640培地 [G. E. More ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (J. Am. Med. Assoc.), 第199巻, 第519頁 (1967年) ]、199培地 [J. F. Morgan ら, プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・エクスペリメンタル・バイオロジー・アンド・メディスン (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.), 第73巻, 第1頁 (1950年) ]、ASF104培地 [味の素 (株) ] などが挙げられる。培養は通常約30

～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪はんを加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばTNM-FH培地[W. F. Hinkら, Nature, 第226巻, 第466頁(1990年)]などが挙げられる。培養は通常約15～30℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪はんを加える。 【0022】

本発明によれば、上記培養物から発現産物（異常受容体などの異常遺伝子産物）を単離するには、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティクロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

本発明によって、異常遺伝子産物を大腸菌、動物培養細胞、昆虫培養細胞などを用いて遺伝子工学的に発現させることによって、高純度で、大量に製造することが可能となった。

#### 【0023】

かくして得られる異常遺伝子産物が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

また、異常遺伝子産物（例、ヒトなどの異常受容体など）のcDNAを用いて真核細胞を用いて発現させ、得られた異常遺伝子産物を用いて、それを作動する化合物を探索するのに用いることができ、あるいは、特定された異常遺伝子産物をコードする遺伝子をDNAプローブとして用いることにより、生体内に発現している異常遺伝子産物のmRNAの含量をノーザンブロッティング法により測定することができる。さらに、該異常遺伝子産物に対する抗体を作製し、生体内における該産物をin situハイブリダイゼーションによって測定することもできる。

この異常遺伝子産物は、異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための薬物のスクリーニング（例、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の異常受容体を有する細胞の伝達系を作動させるための薬物のスクリーニングなど）などに用いることができ、特に、ヒトなどの温血動物において、疾患に関連した異常受容体のアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするのに有用である。

#### 【0024】

上記したスクリーニングについて、以下により具体的に説明する。

上記異常遺伝子産物は、その作動物質を探索するのに有用である。すなわち、該産物と被験物質とを接触させることを特徴とする異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング方法の提供を可能にする。

被験化合物としては、公知のリガンド、合成化合物、ペプチド、蛋白質などの他に、例えば温血哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを上記異常遺伝子産物に添加し、作動活性などを検定しながら分画し、最終的に単一の作動物質を得ることができる。

具体的には、単離された異常遺伝子産物を用いるか、または異常遺伝子産物（例、異常受容体など）の発現系を構築し、該発現系を用いることによって、該産物の作動活性を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）を決定する方法が挙げられる。特に、異常受容体の作動物質をスクリーニングする場合には、異常受容体をコードする遺伝子を細胞で発現させることにより調製された異常受容体を用いるのが好ましい。

#### 【0025】

より具体的には、本発明は、

- ①標識した被験物質を、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）に接触させた場合における、標識した該物質の該産物に対する結合量を測定すること、
- ②標識した被験物質を、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した被験物質の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定すること、

③標識した被験物質を、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した該産物に接触させた場合における、標識した被験物質の該産物に対する結合量を測定すること、

④被験物質を、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）を含有する細胞に接触させた場合における、該産物を介した活性（例えば、増殖促進、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など）を測定し、該物質の作動性を検定すること、および

⑤被験物質を、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した異常遺伝子産物に接触させた場合における、異常遺伝子産物を介する活性（例えば、増殖促進、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など）を測定し、該物質の作動性を検定することなど、または必要に応じて適宜これらを組み合わせることを特徴とする異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング方法を提供する。

標識した被験物質としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{135}\text{S}]$ などで標識した物質が挙げられる。

#### 【 0 0 2 6 】

異常受容体作動物質をスクリーニングするための具体例を以下に説明する。

まず、異常受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、適当なバッファーに懸濁することにより異常受容体標品を調製する。バッファーには、pH4~10（望ましくはpH6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどが用いられるが、被験物質と異常受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80（商品名）

（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる受容体や被験物質の分解を抑える目的でPMSF（フェニルメタンスルホニルフルオリド）、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該受容体溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、〔

14C]などで標識した被験物質を共存させる。非特異的結合量 (NSB)を知るために大過剰の未標識の被験物質を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量 (B) から非特異的結合 (NSB) を引いたカウント (B-NSB) が0cpmを越える被験物質を異常受容体に対するリガンドとして選択することができる。

#### 【 0 0 2 7 】

異常受容体に対する被験物質の作動性を検定するためには、まず、異常受容体を含む細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、被験物質などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。被験物質と異常受容体を含む細胞とを接触させた場合における、該産物を介した活性 (例えば、増殖促進、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など) あるいは c A M P、イノシトールリン酸、カルシウムイオンなどの細胞内伝達系における応答物質の濃度変化などを測定することにより、または被験物質と異常受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した異常受容体に接触させた場合における、異常遺伝子産物を介する活性 (例えば、増殖促進、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など) あるいは c A M P、イノシトールリン酸、カルシウムイオンなどの細胞内伝達系における応答物質の濃度変化などを測定し、該物質の作動性を検定することができる。

#### 【 0 0 2 8 】

また、本発明は、異常遺伝子産物 (例、異常受容体など) と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定し、異常遺伝子産物を実質的に作動



すると判定される薬物を調製することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための薬物を調製する方法、異常受容体と被検物質とを接触させ、異常受容体に対する該物質の作動性を検定し、異常受容体を有する細胞の伝達系を実質的に作動すると判定される物質を調製することを特徴とする、異常受容体に起因する疾患の治療のための物質を調製する方法など、すなわち、ヒト疾患関連構造遺伝子の解析から得られる遺伝子変異と疾病との因果関係を解明する情報に基づいて、確立された新規医薬品創製法ないしは調製法を提供するものである。このように調製された薬物は、異常遺伝子産物に起因する疾患の予防・治療剤として用いるために、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。また、例えば、生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって、目的とする予防・治療剤を製造することができる。

#### 【 0 0 2 9 】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール

）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80（商品名）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は低用量でも効果を奏するため安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。投与量は、対象となる疾患やその症状などにより差異はあるが、高血圧症の治療剤として経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

### 【0030】

さらに本発明は、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）に起因する疾患の治療のための、該産物作動物質の用途、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物に起因する疾患の治療のための物質をスクリーニングするための用途、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物作動物質をスクリーニングするための用途などをも提供するものである。

## 【 0 0 3 1 】

## 【発明の実施の形態】

本願明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を次に挙げる。またアミノ酸に関して光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	：デオキシリボ核酸
A	：アデニン
T	：チミン
G	：グアニン
C	：シトシン
SDS	：ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	：グリシン (G)
Ala	：アラニン (A)
Val	：バリン (V)
Leu	：ロイシン (L)
Ile	：イソロイシン (I)
Ser	：セリン (S)
Thr	：スレオニン (T)
Cys	：システイン (C)
1/2 Cys	：ハーフシスチン
Met	：メチオニン (M)
Glu	：グルタミン酸 (E)
Asp	：アスパラギン酸 (D)
Lys	：リジン (K)
Arg	：アルギニン (R)
His	：ヒスチジン (H)
Phe	：フェニールアラニン (F)
Tyr	：チロシン (Y)

Trp : トリプトファン (W)  
Pro : プロリン (P)  
Asn : アスパラギン (N)  
Gln : グルタミン (Q)  
Apr : アンピシリン耐性遺伝子  
Tcr : テトラサイクリン耐性遺伝子

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳しく説明するが、これらは単なる例であって、本発明を何ら限定するものではない。

### 【0032】

#### 実施例 1 ヒト $\beta 3$ アドレナリン受容体の cDNA クローニング

PCR法によってヒト  $\beta 3$  アドレナリン受容体 cDNA を増幅させるため、既報のヒト  $\beta 3$  アドレナリン受容体の塩基配列 [J.M. Lelias ら, フェブス・レターズ (FEBS Lett.), 第324巻、第127頁 (1993年)] を参考にして以下に示す 2 種類 (NO. 1 と NO. 2) のプライマーを合成した。

センス・プライマー No. 1 :

5'-ATTTGGGAGACCCCTCCTTCCTTCTTTCC-3'

(配列番号 : 1)

アンチセンス・プライマー No. 2 :

5'-ACAGAGTTGTTGCTTCTTGTCCTTCAGGCC-3'

(配列番号 : 2)

TaKaRa Ex Taq [宝酒造(株)] および添付のバッファーを用い、以下のPCR反応を行った。ヒト脂肪細胞由来cDNA ライブラリー (CLONTECH Laboratories, Inc.) 0.5  $\mu$ l を鋳型に添付のPCR反応バッファー (10 倍濃度) 5  $\mu$ l、dNTP混合液 4  $\mu$ l、TaKaRa Ex Taq 0.5  $\mu$ l (2.5 U)、2 種類のプライマー (上記 No. 1 と  $\lambda$ gt 11 フォワード・プライマー [宝酒造(株)] および上記 No. 1 と  $\lambda$ gt 11 リバース・プライマー [宝酒造(株)] の組み合わせ; 各 100pmol) を各々、別々のチューブに添加し、滅菌蒸留水で 50  $\mu$ l とした。94℃、2 分間、61℃、1 分間、72℃、1 分間の PCR 反応を各々 25 回繰り返し、2 本を混合し、さらに、その混合反応液 5  $\mu$ l に 2 種類のプライマー (上記 No. 1 と No. 2 ; 各 100pmol) を添加し、94℃、

2 分間、55℃、1 分間、72℃、1 分間の PCR 反応を 30 回繰り返した。PCR 産物を 1 % アガロースゲル電気泳動で分離したところ、ヒト  $\beta 3$  アドレナリン受容体の塩基配列から予想される大きさ (1310bp) に相当する位置に増幅された DNA 断片を確認した。この DNA 断片をアガロースゲルから回収し、プラスミド・ベクター pUC 19 [宝酒造(株)] の SmaI 部位に挿入し、p19-h  $\beta 3$ R を作製した。cDNA 部分の塩基配列をジデオキシヌクレオチド合成鎖停止法 [J. Messing ら、ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acid Res.)、第 9 巻、第 309 頁 (1981 年)] により決定し、既報の配列と同一のものであることを確認した。

### 【0033】

実施例 2 ヒト  $\beta 3$  アドレナリン受容体の変異 (Trp64Arg) DNA の作製

変異導入用合成オリゴヌクレオチドを合成し、Mutan-Super Express Km [宝酒造(株)] を用いて以下のように行った。

変異導入用合成オリゴヌクレオチド No. 3 :

5' -TGGCCATCGCCCGGACTCCGAG-3'

(配列番号: 3)

実施例 1 に記載のプラスミド p19-h  $\beta 3$ R を制限酵素 EcoRI と XbaI で消化して得られた DNA 断片をアガロースゲルから回収し、キット添付のプラスミドベクター pKF 18k [宝酒造(株)] の EcoRI と XbaI 部位に挿入し、p18k-h  $\beta 3$ R を作製した。この DNA の 10ng を鋳型に添付のセレクションプライマー 5 pmol と上記 No. 5 プライマー 5 pmol、反応バッファー (10 倍濃度) 5  $\mu$ l、dNTP 混合液 4  $\mu$ l、TaKaRa LA Taq 0.5  $\mu$ l (2.5 U) を添加し、滅菌蒸留水で 50  $\mu$ l とし、94℃、1 分間、55℃、1 分間、72℃、3 分間の PCR 反応を 25 回繰り返して行った後、エタノール沈澱によって DNA を回収した。この DNA を 5  $\mu$ l の滅菌蒸留水に溶解し、2  $\mu$ l を使用して添付の大腸菌 MV1184 株に導入し、カナマイシン含有 (50  $\mu$ g/ml) LB プレートで生育する形質転換体を得た。これらの形質転換体のうち数クローンについて変異部位の塩基配列を決定し、変異の導入を確認したクローンを p18k-h  $\beta 3$  (W64R) R と命名した。

### 【0034】

実施例 3 ヒト  $\beta 3$  アドレナリン受容体遺伝子を動物細胞で発現させるための組

## 換えDNAの作製

実施例 1 に記載のプラスミド p19-h $\beta$  3R を EcoRI と XbaI で消化した後、ヒト  $\beta$  3 アドレナリン受容体 cDNA の断片をアガロースゲルから回収した。次に、動物細胞における一過性発現用のベクター pME18S [R. Sasada ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.)、第 190 巻、第 1173 頁 (1993 年)] の EcoRI と XbaI 部位に、上述の cDNA 断片を挿入し、発現プラスミド ph $\beta$  3R201 を作製した。次に、安定発現株選択のために、薬剤耐性マーカーであるネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を以下のように組み込んだ。まず、プラスミド ph $\beta$  3R201 の KpnI 部位と SspI 部位の間に、SV40 初期プロモーターと neo 遺伝子、SV40 ポリ A 付加シグナルから成る断片を挿入し、プラスミド ph $\beta$  3R203 を作製した。

実施例 2 に記載のプラスミド p18k-h $\beta$  3 (W64R) R を EcoRI と XbaI で消化した後、ヒト  $\beta$  3 アドレナリン受容体変異 cDNA の断片をアガロースゲルから回収した。上述の方法と同様に行い、プラスミド ph $\beta$  3 (W64R) R201 および ph $\beta$  3 (W64R) R203 を作製した。

## 【 0 0 3 5 】

### 実施例 4 ヒト $\beta$ 3 アドレナリン受容体遺伝子の動物細胞における発現

実施例 3 記載のプラスミド (ph $\beta$  3R203 および ph $\beta$  3 (W64R) R203) の CHO 細胞 (チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞) への遺伝子導入を Mammalian Transfection Kit (STRATAGENE, CA, USA) を用いて以下のように行った。

80cm<sup>2</sup> フラスコに完全培地 [10% (v/v) FCS (牛胎児血清) を含む ハム F-12 培地 (LIFE TECHNOLOGIES, INC.)] 15ml を添加し、CHO 細胞を  $5 \times 10^5$  個播種した。この培養液を 5% の二酸化炭素存在下、37℃ で一夜培養した後、10ml の上記培地と交換した。実施例 1 に記載のプラスミド (ph $\beta$  3R203) 30  $\mu$ g に滅菌水を加えて 450ml とし、上記キット中の solution #1 を 50  $\mu$ l 加え、さらに solution #2 を 500  $\mu$ l 添加し混合した。室温で 15 分間放置後、この混合液 1ml を細胞上に滴下して混合し、3% の二酸化炭素存在下、37℃ で一夜培養した。翌日、培地を除き、F-12 培地 (無血清) で細胞表面を洗った後、完全培地 (10% FCS/F-12) 15ml を添加して 5% の二酸化炭素存在下、37℃ で一夜培養した。翌日、10% FCS を含む D-MEM/F-12 培地 [日

研生物医学研究所(株)] を分注(1ml/ウエル)した12穴プレートに1ウエルあたり約200個の上記細胞を播種し、一夜培養後、G418(LIFE TECHNOLOGIES, INC.)を400 $\mu$ g/ml含む培地(10%FCS/D-MEM/F-12)で3日から4日毎に培地交換をしながら、コロニー形成が認められるまで培養した。コロニー形成が多数認められた後、400 $\mu$ g/mlのG418を含む10%FCS/D-MEM/F-12培地を分注(2ml/ウエル)した24穴プレートに1ウエルあたり1から数個のコロニーを播種培養し、G418耐性細胞を取得した(1次クローニング)。次に、1次クローニングの細胞のうち2から3ウエルの細胞についてG418の濃度を800 $\mu$ g/mlに上げて24穴プレートに1ウエルあたり10個のコロニーを播種培養し、G418耐性細胞を取得した。これらの細胞から、下記の実施例5に示す方法によってヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体高発現株を選択した(2次クローニング)。

#### 【0036】

##### 実施例5 ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体発現細胞のcAMP活性測定

cAMP活性測定はcAMP ELA SYSTEM(Amersham, UK)を用いて以下のように行った。

実施例4で得られた24穴プレート上のヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体発現細胞(CH0/ph $\beta$ 3R203 およびCH0/ph $\beta$ 3(W64R)R203)の培養液をG418を含まない培地(10%FCS/D-MEM/F-12)に交換し、0.5mM IBMX [3-isobutyl-1-methylxanthine; 和光純薬(株)] を添加した。5%の二酸化炭素存在下、37℃で30分間培養後、 $10^{-5}$ M イソプロテレノール [( $\pm$ )-isoproterenol; フナコシ(株)] を添加し、さらに30分間培養した。次に、細胞表面を4℃のPBS(リン酸緩衝液)で3回洗い、0.1N塩酸を300 $\mu$ l添加し、95℃で10分間煮沸した。各ウエルから25 $\mu$ lを分取し、キット添付のassay buffer 75 $\mu$ lに溶解した。この溶解液から50 $\mu$ lを分取し、キット添付の抗ウサギIgGロバ抗体固相化96穴マイクロタイタープレートの各ウエルに抗cAMPウサギ抗体100 $\mu$ lとともに分注し、4℃で1時間放置した。次に、HRP標識cAMPを100 $\mu$ l添加し、さらに4℃で1時間放置後、各ウエルを4回洗浄し、TMB(3,3,5,5-tetramethylbenzidine)を150 $\mu$ l添加し、室温で60分間放置後、各ウエルに1N硫酸を100 $\mu$ l添加して450nmの波長で吸光度を測定した。 $\beta$ アドレナリン受容体の作動薬であるイソプロテレノールによってcAMP活性が上昇する細胞株を選択

した。

### 【 0 0 3 7 】

#### 実施例 6 変異型ヒト $\beta 3$ アドレナリン受容体の結合活性の測定

Trp64Arg変異型ヒト  $\beta 3$  アドレナリン受容体を発現させたチャイニーズ・ハムスターの卵巢由来細胞株であるCHO細胞を作製し、Trp64Arg変異型  $\beta 3$  アドレナリン受容体特異的に結合する化合物を探索した。Trp64Arg変異型  $\beta 3$  アドレナリン受容体を発現させたCHO細胞を氷冷したリン酸緩衝液で3回洗浄後、氷冷した低張液(1mM トリス塩酸緩衝液、pH7.2)に10分間浸し、細胞を剥離回収した後、4℃で15分間18000rpmで遠心分離して該受容体を含有する細胞膜画分を回収した。得られた細胞膜画分にTME緩衝液(75mM トリス塩酸緩衝液、pH7.4、12.5mM 塩化マグネシウム、1.5mM EDTA、4  $\mu$ M デシプラミン、5  $\mu$ g/ml ロイペプチン、1  $\mu$ g/ml ベンザミジン、5  $\mu$ g/ml トリプシン阻害剤 および40  $\mu$ g/ml バシトラシン)を加え、25ゲージの注射針を用いて均一に懸濁し受容体標品とした。調製した受容体標品(蛋白質として10-30  $\mu$ g含有)と[ $^{125}$ I]-ヨードシアノピンドロール(240pM、DuPont-NEN、USA)および化合物を混合し、最終的に250  $\mu$ lになるようTME緩衝液で容量を調節し、室温にて90分間静置した。グラスファイバーフィルター(GF/B、Packard Instrument Co., Inc., USA)およびセルハーベスター(Filter Mate Cell Harvester、Packard Instrument Co., Inc. USA)を用いて吸引濾過し、フィルターの放射活性をシンチレーションカウンター(TopCount Microplate Scintillation Counter、Packard Instrument Co., Inc. USA)を用いて測定した。非特異的結合は、(S)-(-)-プロプラノロール(Sigma、USA)を終濃度100  $\mu$ M添加することにより求めた。

### 【 0 0 3 8 】

#### 実施例 7 変異型ヒト $\beta 3$ アドレナリン受容体発現CHO細胞における c A M P 上昇活性の測定

Trp64Arg変異型ヒト  $\beta 3$  アドレナリン受容体を発現させたチャイニーズ・ハムスターの卵巢由来細胞株であるCHO細胞を96ウェルマイクロタイタープレートに播種し(1x10<sup>4</sup>細胞/ウェル)、コンフルエントに達してから72時間培養後に被験化合物を添加し、40分間、37℃で静置した(100  $\mu$ l/ウェル)。細胞を4℃のリン酸緩



衝液で3回洗浄後、0.1N塩酸を添加し、95℃で10分間煮沸した。各ウェルから25  $\mu$ lを採取し、cAMP EIA SYSTEM (Amersham、UK) 付属のアッセイ緩衝液75  $\mu$ lに溶解し、そのうちの50  $\mu$ lをサンプルとして上記cAMP EIA SYSTEMを用いて定量した。方法は以下のとおりである。抗ウサギIgGロバ抗体固相化96ウェルマイクロタイタープレートに上記のサンプル(50  $\mu$ l)および抗cAMPウサギ抗体を100  $\mu$ l添加し、4℃で2時間静置し、更にホース・ラディッシュ・パーオキシダーゼ(HRP)標識cAMPを100  $\mu$ l添加し、4℃で1時間静置した。各ウェルを吸引した後、洗浄液で4回洗浄(400  $\mu$ l/ウェル)した。次に、各ウェルにHRPの基質であるテトラメチルベンチジンを150  $\mu$ l添加し、室温で振盪しながら60分間インキュベーションした。最後に各ウェルに1.0N硫酸を100  $\mu$ l添加して反応を終了させた後、波長450nmで吸光度を測定することによりcAMP量を定量した。その結果、CHO細胞内のcAMP濃度が添加した化合物の濃度に依存して増加し、その増加は化合物未添加の場合に比較して有意であった。

#### 【0039】

##### 実施例8 化合物の探索

実施例6の方法に従い化合物の探索を行った結果、Trp64Arg変異型ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体に親和性の高い化合物が見い出された。該化合物を実施例7の方法に従って実験を行った結果、その添加濃度に応じてTrp64Arg変異型ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体を発現させたCHO細胞内のcAMP濃度を上昇させることが見い出された。

#### 【0040】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：センス

配列：

ACAGAGTTGT TGCTTCTTGT CCTTCAGGCC

## 【 0 0 4 1 】

配列番号： 2

配列の長さ： 30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：アンチセンス

配列：

ACAGAGTTGT TGCTTCTTGT CCTTCAGGCC

## 【 0 0 4 2 】

配列番号： 3

配列の長さ： 22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：センス

配列：

TGGCCATCGC CCGGACTCCG AG

**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 疾患に関連する構造遺伝子の解析から得られる情報、遺伝子変異と疾患との因果関係を解明する情報などを用いることにより、疾患原因からの創薬アプローチを可能にさせる新規創薬技術およびこの新規医薬品創製法に基づいて調製される異常遺伝子産物作動物質の用途を提供する。

**【解決手段】** (1) 異常遺伝子産物作動物質を含有してなる、該産物に起因する疾患の予防・治療剤；(2) 異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための、該産物作動物質の用途；(3) 異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング方法；および(4) 異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定し、異常遺伝子産物を実質的に作動すると判定される薬物を調製することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための薬物を調製する方法。

**【選択図】** なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100073955

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100077012

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町 2 - 1 7 - 8 5 武田  
薬品工業株式会社内

【氏名又は名称】 岩谷 龍

特願平 0 9 - 0 8 3 7 5 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 2 9 3 4 ]

1. 変更年月日 1 9 9 2 年 1 月 2 2 日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号

氏 名 武田薬品工業株式会社